

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica



TESIS DOCTORAL

**Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos
de sílice y de carbón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandra Nieto Peña

Directora:

María Vallet-Regí

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-8493-7

© Alejandra Nieto Peña, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica



APLICACIONES BIOMÉDICAS DE MATERIALES MESOPOROSOS DE SÍLICE Y DE CARBÓN

Alejandra Nieto Peña

MEMORIA para optar al grado de
DOCTOR - mención Doctor Europeo

DIRECTORA

María Vallet-Regí

Catedrática de Química Inorgánica

Madrid, 2010

ABREVIATURAS

a_0	parámetro de celda
d_{10}	espaciado interplanar de la reflexión (10)
P/P_0	presión relativa
S_{BET}	superficie específica calculada por el método B.E.T. (Brunauer, Emmer, Teller)
D_p	diámetro de poro
V_T	volumen total de poro
$V_{\mu p}$	volumen de microporo
t_w	espesor de pared
σ_0	densidad de carga superficial
γ	energía libre superficial
γ^{AB}	interacción ácido-base de Lewis
γ^{LW}	interacción de Lifshitz-Van der Waals
θ	ángulo de contacto
IEP	punto isoeléctrico
PZC	punto de carga cero
X_p	grado de polaridad
R	relación mol H ₂ O/mol TEOS
E	módulo de Young
σ	tensión
ε	deformación

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN / SUMMARY	1
OBJETIVOS	11
<u>PARTE I. BIOMATERIALES DE SÍLICE</u>	
I.1.- ESTADO DEL ARTE	13
I.1.1.- SÍNTESIS DE MATERIALES POROSOS DE SÍLICE	
I.1.1.1.- Proceso sol-gel.....	14
I.1.1.2.- Materiales mesoporosos ordenados.....	17
I.1.2.- FUNCIONALIZACIÓN DE MATERIALES MESOPOROSOS	
ORDENADOS DE SÍLICE	25
I.1.3.- BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE	
MATERIALES POROSOS DE SÍLICE	29
I.1.4.- APLICACIONES BIOMÉDICAS DE MATERIALES POROSOS	
DE SÍLICE	
I.1.4.1.- Evolución histórica de los materiales porosos de sílice	
en el campo de las aplicaciones biomédicas.....	32
I.1.4.2.- Bioencapsulación.....	36
I.1.4.3.- Liberación controlada de moléculas biológicamente activas.....	40
I.1.4.4.- Infección en biocerámicas.....	48
I.2.- SÍNTESIS DE SÍLICE POROSA POR TECNOLOGÍA SOL-GEL PARA	
LA ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS	51
I.3.- ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS	
BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS	63
I.3.1.- ALENDRONATO SÓDICO EN SÍLICES MESOPOROSAS	
SBA-15 FUNCIONALIZADAS	65
I.3.2.- DOSIFICACIÓN <i>VERSUS</i> FUNCIONALIZACIÓN	77
I.4.- RESISTENCIA A LA INFECCIÓN	91
I.5.- PROPIEDADES MECÁNICAS	103
I.6.- CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	131

PARTE II. CARBÓN MESOPOROSO ORDENADO

II.1.- ESTADO DEL ARTE.....135

II.1.1.- MATERIALES POROSOS DE CARBÓN

II.1.1.1.- Estrategia de nanomoldeo con plantillas.....137

II.1.1.2.- Síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbón.....141

II.1.1.3.- Aplicaciones de materiales mesoporosos ordenados
de carbón.....147

II.1.2.- HIDROXIAPATITA

II.1.2.1.- Fosfatos de calcio tipo apatita.....150

II.1.2.2.- Obtención de hidroxiapatita combinando el método de
precipitación con el proceso de nanomoldeo.....153

II.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1.- MATERIALES DE SÍLICE

II.2.1.1.- Síntesis de SBA-15.....155

II.2.1.2.- Síntesis de MCM-48.....155

II.2.1.3.- Funcionalización de materiales de sílice.....156

II.2.2.- MATERIALES DE CARBÓN

II.2.2.1.- Síntesis de CMK-3 a partir de SBA-15

II.2.2.1.1.- Impregnación con sacarosa.....157

II.2.2.1.2.- Síntesis directa.....158

II.2.2.1.3.- Síntesis en una etapa.....159

II.2.2.2.- Síntesis de CMK-1 a partir de MCM-48.....160

II.2.2.3.- Síntesis de C-ORNL-1.....161

II.2.3.- SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA A PARTIR DE MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS DE CARBÓN.....164

II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1.- MATERIALES ORDENADOS DE CARBÓN.....167

II.3.2.- MATERIALES DE SÍLICE FUNCIONALIZADOS.....188

II.3.3.- POLARIDAD DE LAS SUPERFICIES

II.3.3.1.- Desorción de agua por termogravimetría.....191

II.3.3.2.- Isotermas de adsorción de agua e hidrocarburos.....193

II.3.4.- HIDROXIAPATITA POR PRECIPITACIÓN Y NANOMOLDEO CON CARBÓN MESOPOROSO ORDENADO.....198

II.4.- CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....217

PARTE III. APÉNDICES

III. 1. LISTA DE PUBLICACIONES.....	229
III. 2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	231
III. 3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	233
III.3.1.- Análisis termogravimétrico y térmico diferencial (TGA/DTA)	
III.3.2.- Microanálisis elemental de C, H, N	
III.3.3.- Difracción de rayos X (XRD)	
III.3.4.- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	
III.3.5.- Espectroscopía Raman	
III.3.6.- Espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF)	
III.3.7.- Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX)	
III.3.8.- Resonancia magnética nuclear de ²⁹ Si y ¹³ C (NMR)	
III.3.9.- Porosimetría de adsorción de gases	
III.3.10.- Potencial zeta (ζ)	
III.3.11.- Ángulo de contacto (θ) y energía libre superficial (γ)	
III.3.12.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	
III.3.13.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)	
III.3.14.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	

<u>PARTE V. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	245
--	------------

RESUMEN

El proceso sol-gel es una ruta de síntesis muy versátil que permite obtener materiales porosos de sílice para su empleo como biomateriales en aplicaciones biomédicas. Tomando esta sílice sencilla como punto de partida, es posible dar un paso más allá y obtener materiales mesoporosos ordenados de sílice utilizando agentes directores de estructura que actúen como plantilla durante la síntesis. La porosidad ordenada y controlada generada en el rango de 2-20 nm tras la eliminación de la plantilla, junto con las excelentes propiedades texturales y la posibilidad de inducir bioactividad en la sílice, permiten aplicar estos materiales como sistemas de liberación controlada de moléculas biológicamente activas con interés en la regeneración de tejido óseo. En una siguiente etapa, el empleo de la estrategia de nanomoldeo para obtener materiales mesoporosos ordenados de carbono como réplica inversa de la sílice mesoestructurada utilizada como plantilla, permite establecer comparaciones basadas en la distinta naturaleza química de la superficie de la sílice y el carbón. La aproximación seguida en la presente tesis ha permitido la evaluación del comportamiento *in vitro* de estos materiales como adsorbentes para confinar especies biológicamente activas centrando la atención en sus potenciales aplicaciones en biomedicina. Además, el concepto de nanomoldeo sucesivo permitiría a su vez la obtención de fosfatos de calcio empleando los materiales de carbón como plantilla.

Así, el estudio de esta familia de materiales porosos sintetizados y cuidadosamente caracterizados nos muestra una visión amplia del proceso sol-gel. La versatilidad de esta ruta de síntesis ha permitido obtener materiales biocompatibles con porosidad ordenada y composición y propiedades texturales apropiadas para su uso en biotecnología. Por un lado, ha sido posible la encapsulación de células vivas en geles porosos de sílice para su futura aplicación en el diseño de órganos artificiales o como biosensores y

biorreactores. Por otro lado, en lo que se refiere a la aplicación concreta de los materiales mesoporosos ordenados de sílice para la liberación controlada de fármacos y como sistemas para la regeneración ósea, se han estudiado estrategias basadas en la modificación de la superficie de las matrices inorgánicas. De esta manera, los esfuerzos se han centrado en conseguir ajustar la dosis de la biomolécula capaz de ser liberada en un determinado momento con el fin de cumplir con las necesidades clínicas concretas de cada caso específico. También, se ha evaluado el comportamiento *in vitro* de estas biocerámicas frente a la infección bacteriana en un hipotético implante y el comportamiento mecánico a compresión tras su conformado en piezas tridimensionales empleando diversas estrategias. Por otro lado, las excelentes propiedades texturales de los materiales mesoporosos ordenados de carbono obtenidos por diversas rutas, su caracterización estructural y el estudio de la polaridad de su superficie, han permitido establecer comparaciones con los materiales de sílice. Extendiendo aún más el concepto de nanomoldeo, estos materiales mesoestructurados de carbono se han utilizado como plantillas en la síntesis de hidroxapatita, componente mineral del hueso, con objeto de ejercer un control en la estructura porosa de este fosfato de calcio.

El trabajo principal de esta tesis ha consistido en la síntesis de materiales porosos combinando el proceso sol-gel y el método de nanomoldeo con plantillas duras y blandas (*hard-templating* y *soft-templating*) para obtener materiales mesoporosos ordenados de sílice y de carbón con aplicaciones en biomedicina.

Esta tesis se ha dividido en dos partes. La parte I recoge el trabajo realizado sobre biomateriales de sílice. Se inicia con el estado del arte en este tema e incluye cuatro capítulos que han dado lugar a cuatro publicaciones científicas.

El capítulo “*Síntesis de sílice porosa por tecnología sol-gel para la encapsulación de células*” (artículo I), ha puesto a punto un método sol-gel biocompatible con la encapsulación de células vivas durante la síntesis. Las condiciones del proceso se han optimizado para permitir la incorporación de células vivas y el conformado tridimensional en moldes cilíndricos. Se han obtenido monolitos en estado húmedo aptos para su manipulación en un entorno similar al medio fisiológico. El estudio de la viabilidad celular a corto plazo ha demostrado la no toxicidad de la sílice en estos sistemas.

El capítulo “*Adsorción y liberación de moléculas biológicamente activas*” (artículos II y III), ha estudiado la adsorción de biomoléculas en matrices mesoporosas ordenadas de sílice así como su posterior liberación en condiciones *in vitro*. Esto es, el empleo de estos materiales como sistemas locales de liberación controlada de biomoléculas. Por un lado, en el artículo II, “*Alendronato sódico en sílices mesoporosas SBA-15 funcionalizadas*”, se ha estudiado la adsorción de alendronato sódico, un potente inhibidor de la reabsorción ósea a pequeñas dosis y que presenta baja biodisponibilidad administrado por vía oral. Las matrices de sílice mesoporosa tipo SBA-15 han sido funcionalizadas en distintos grados con grupos orgánicos aminopropilo mediante dos métodos de funcionalización post-síntesis. El objetivo ha sido estudiar el efecto del grado de modificación orgánica de la superficie de la matriz como estrategia para modular la dosificación de fármaco, en vistas a su aplicación en terapias de regeneración ósea.

Por otro lado, el artículo III, “*Dosificación versus funcionalización*”, ha estudiado cómo alcanzar un nivel de predicción adecuado en lo que concierne a la dosificación local de biomoléculas desde matrices mesoporosas funcionalizadas. Así, siguiendo de manera lógica el desarrollo del artículo II, se han funcionalizado matrices SBA-15 con grupos orgánicos de naturaleza diversa y se ha estudiado la adsorción y liberación de tres moléculas modelo con interés en biotecnología y regeneración ósea: el fármaco bisfosfonato ácido zoledrónico, el aminoácido *L*-triptófano y la proteína albúmina sérica bovina, prestando especial atención a las interacciones biomolécula-matriz. El estudio detallado de la electroquímica de las superficies ha demostrado que su influencia es clave para ser capaces de predecir y modular el comportamiento de estos sistemas para la liberación controlada de biomoléculas.

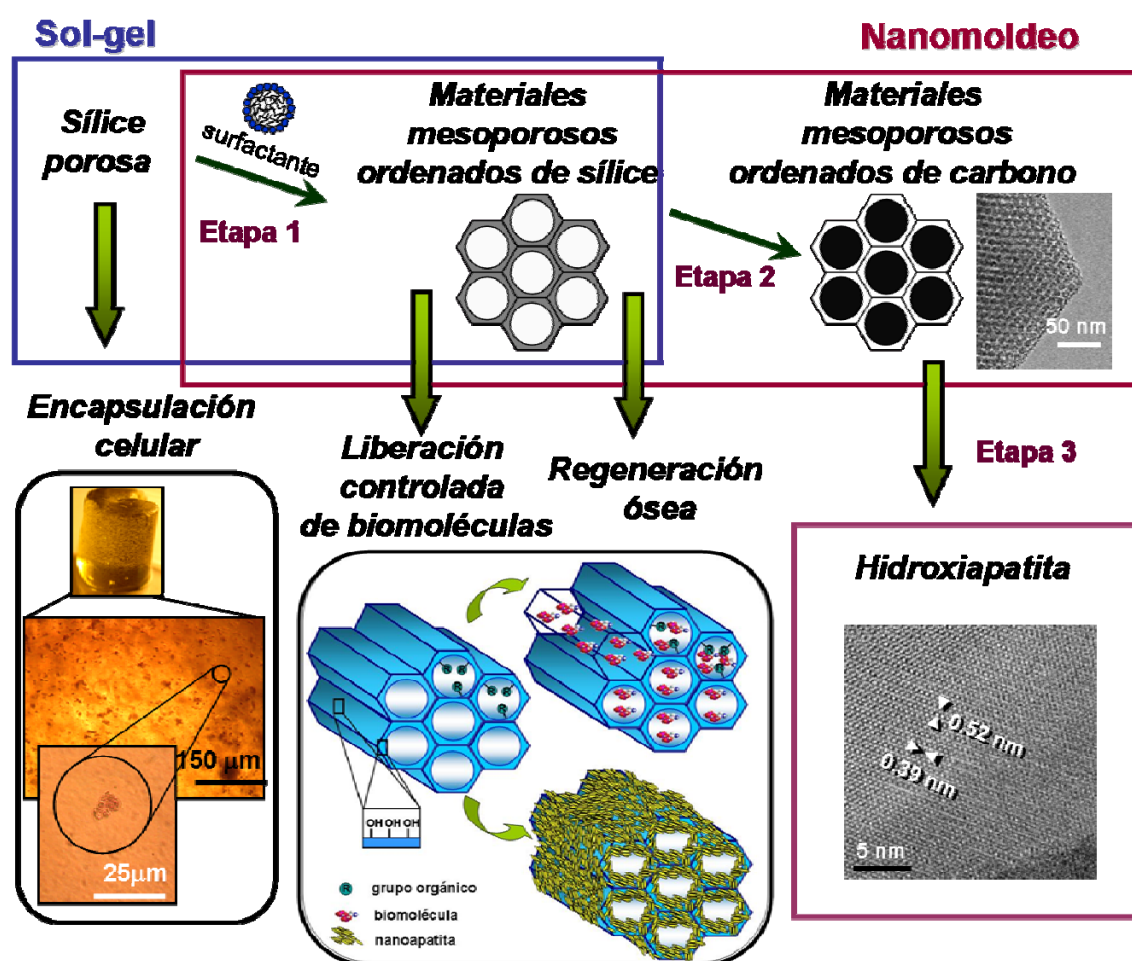
El capítulo “*Resistencia a la infección*” (artículo IV), ha estudiado los procesos de infección relacionados con bio-cerámicas con vistas al diseño de biomateriales implantables resistentes a la adherencia de bacterias patógenas. La finalidad de este trabajo ha sido estudiar la adherencia bacteriana en la superficie de materiales mesoporosos de sílice, conformados en forma de discos a baja presión. Se ha relacionado con las propiedades intrínsecas de estos materiales, tales como composición química, nanoestructura y reactividad. Se ha observado que tanto la porosidad intergranular como el tamaño de grano y su morfología influyen predominantemente

sobre la adherencia bacteriana. De esta manera, los aspectos microestructurales resultantes del procesado del material demuestran ser los principales responsables de la adherencia bacteriana, relegando así la influencia de la mesoporosidad ordenada a un segundo plano.

Por último, el capítulo “*Propiedades mecánicas*” (artículo V) ha estudiado las propiedades mecánicas de biocerámicas a compresión. El objetivo ha sido estudiar el comportamiento mecánico de biocerámicas basadas en materiales mesoporosos de sílice conformados en piezas bajo presión uniaxial o a baja temperatura, incorporando el polímero natural agarosa. Así, la agarosa incorporada al material en polvo en la concentración adecuada mejora las propiedades mecánicas, disminuyendo la fragilidad de los materiales, ya que rodea y envuelve las partículas de mesoporosos proporcionando cohesión a las piezas. Además, la capacidad de la agarosa para incorporar agua en su estructura de hidrogel permite ajustar el tamaño y la forma de las piezas en contacto con fluidos fisiológicos. El interés de este estudio radica pues en el empleo de estas biocerámicas como matrices para albergar moléculas biológicamente activas que promuevan la regeneración ósea a la vez que como materiales de relleno ajustables en pequeños defectos óseos que no tengan que soportar elevadas cargas.

La parte II de esta tesis es un estudio de carbones mesoporosos ordenados. Se inicia con el estado del arte en este tema. El trabajo principal se ha centrado en la obtención de réplicas inversas en carbón de los materiales mesoporosos ordenados de sílice mediante diversas aproximaciones basadas en el concepto de nanomoldeo con plantillas, así como su completa caracterización mediante diversas técnicas. Este estudio ha permitido establecer una comparación de la superficie de carbón con la superficie de la sílice en cuanto a propiedades texturales y polaridad. Por último, se ha utilizado el carbón mesoestructurado como plantilla en la síntesis de hidroxiapatita, el material más similar al componente mineral del hueso y el fosfato de calcio más utilizado en la práctica clínica. La hidroxiapatita presenta buenas propiedades como biomaterial tales como biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad. El control de las propiedades texturales de la hidroxiapatita permitiría aumentar su reactividad y supondría una ventaja para su aplicación en regeneración de tejido óseo.

De forma esquemática se puede seguir el trabajo realizado a lo largo de esta tesis doctoral en el siguiente diagrama.



Esquema 1. Trabajo realizado a lo largo de la presente tesis doctoral.

SUMMARY

The sol-gel process is a versatile synthetic route for obtaining porous inorganic silica materials as biomaterials for use in biomedical applications. Taking this simple silica as starting point, it is possible to go further and obtain ordered mesoporous silica materials by using structure directing agents to act as a template during synthesis. The ordered and controlled porosity generated in the range of 2-20 nm after template removal, together with the excellent textural properties and the possibility to induce bioactivity to the obtained silica, allows applying these materials as delivery systems of biologically active molecules with applicability in bone tissue regeneration. In the next step, the use of the nanocasting strategy for the synthesis of ordered mesoporous carbon materials as an inverse replica of the mesostructured silica used as a template, allows drawing comparisons based on the different chemical nature of the surface of silica and carbon. The approach followed in this thesis has allowed an evaluation of the *in vitro* behavior of these materials as adsorbents to confine biologically active species focusing on their potential applications in biomedicine. Furthermore, the concept of repeated templating enables obtaining calcium phosphate materials by using carbon materials as a template.

Thus, the study of this carefully characterized family of porous materials shows a broad vision of the sol-gel process. The versatility of this synthetic route has led to ordered porous biocompatible materials of defined textural properties and composition with applications in biotechnology. On one hand, it has been possible the encapsulation of living cells in porous silica gels for the future design of artificial organs or biosensors and bioreactors. On the other hand, regarding the specific application of ordered mesoporous silica materials for controlled release of drugs and as systems for bone tissue regeneration, several strategies based on the surface modification of the inorganic matrices have been studied. Thus, efforts have been focused on adjusting the dose of

biomolecule that can be released to meet specific clinical needs. Furthermore, the *in vitro* behavior of these bioceramics against bacterial infection in a hypothetical implant as well as their mechanical behavior, have been evaluated. Additionally, the excellent textural properties of the ordered mesoporous carbon materials obtained by several routes, their structural characterization and the study of their surface polarity has allowed to draw comparisons with silica materials. Further extending the notion of nanocasting, these mesostructured carbon materials have been used as templates for the synthesis of hydroxyapatite, mineral component of bone, with the aim of controlling the porous structure of said calcium phosphate.

The main purpose of this thesis has been the synthesis of porous materials by combining the sol-gel method with the nanocasting method, using soft and hard templates, for the obtention of ordered mesoporous silica and carbon materials for biomedical applications.

This thesis has been divided into two parts. Part I encompasses the work carried out regarding silica biomaterials. It begins with a description of the state of the art in this topic and contains four chapters that have given rise to four research papers.

The chapter "*Synthesis of porous silica by the sol-gel technology for cell encapsulation*" (Article I), has dealt with the development of a biocompatible sol-gel method for the encapsulation of living cells during synthesis. The process conditions have been optimized to allow the incorporation of living cells and the shaping of the obtained silica as three-dimensional monolithic pieces in the wet state, suitable for a physiological-like environment. The study of short-term cell viability has demonstrated the non-toxicity of silica in these systems.

The chapter "*Adsorption and release of biologically active molecules*" (Articles II and III) encompasses the adsorption of biomolecules in mesoporous ordered silica matrices and their subsequent release *in vitro*. That is, the use of these materials as local systems for the controlled release of biomolecules. On one hand, "*Sodium alendronate in functionalized SBA-15 mesoporous silica*" (Article II), has dealt with the adsorption of sodium alendronate, a potent antiresorptive from which only small doses are needed and which shows low bioavailability when orally administered. The mesoporous silica matrix SBA-15 has been functionalized with aminopropyl functional groups in several

degrees by employing two different post-synthesis functionalization approaches. The objective has been to study the effect of the degree of matrix modification as a strategy to modulate the dosage of the drug, for the application of these systems in bone regeneration technologies.

On the other hand, "*Dosage versus functionalization*" (Article III), has investigated how to reach an adequate level of prediction regarding local dosage of biomolecules from functionalized mesoporous matrices. Therefore, following the main idea of Article II, SBA-15 matrices have been functionalized with organic functional groups of diverse nature and the adsorption and release of three model molecules of interest in bone regeneration technology and biotechnology, namely the bisphosphonate zoledronic acid, the amino acid *L*-tryptophan and the protein bovine serum albumin, has been studied. Special attention has been conveyed to biomolecule-matrix interactions. The detailed study of the electrochemistry of surfaces has shown to be a key factor for the prediction and modulation of their behavior as controlled release systems of biomolecules.

The chapter entitled "*Resistance to infection*" (Article IV), has studied the processes of infection related to bioceramics for the future design of implantable biomaterials resistant to the adherence of pathogenic bacteria. The purpose of this study has been to investigate the bacterial adherence on the surface of mesoporous silica materials shaped as disks under low pressure, in order to relate it to the intrinsic properties of these materials, such as chemical composition, nanostructure and reactivity. It has been observed that the intergranular porosity, grain size and morphology mainly influence on bacterial adherence. Therefore, microstructural aspects resulting from the processing of the material have shown to be primarily responsible for bacterial adherence, thus consigning the influence of ordered mesoporosity to a second place.

Finally, the chapter "*Mechanical properties*" (Article V) has studied the mechanical properties of bioceramics under compression. The objective has been the assessment of the mechanical behavior of mesoporous silica bioceramics shaped into pieces either by applying uniaxial pressure or by following a low temperature shaping method through the incorporation of the natural polymer agarose to the powdered silica material. An appropriate amount of agarose improves the mechanical properties of the materials by decreasing their fragility. Agarose covers and surrounds mesoporous silica particles,

thus providing cohesion to the tridimensional pieces. In addition, the ability of agarose hydrogel to absorb water within its structure, allows adjusting the size and shape of the pieces when in contact with physiological fluids. The interest of this study lies in the use of these bioceramics as host matrices for biologically active molecules able to promote bone regeneration while acting as fillers adjustable in small bone defects in non load-bearing applications.

Part II of this thesis focuses on ordered mesoporous carbons. It begins with a description of the state of the art in this issue. The main work has been focused on the synthesis of ordered mesoporous carbon materials as inverse replica of ordered mesoporous silica materials by using various approaches based on the concept of template nanocasting, as well as on their complete physico-chemical characterization. This study has allowed drawing comparisons between the carbon and silica surfaces in terms of textural properties and polarity. Finally, mesostructured carbon has been used as a template for the synthesis of hydroxyapatite, the calcium phosphate most commonly used in clinical practice as it is the material more similar to bone mineral component. Hydroxyapatite has good properties as a biomaterial such as biocompatibility, osteoconduction and direct link to the bone. Control of the textural properties of hydroxyapatite can increase its reactivity and represents an advantage for its application in bone tissue regeneration.

The work performed in this thesis is depicted in the following schema.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha consistido en la síntesis de materiales porosos combinando el proceso sol-gel y el método de nanomoldeo con plantillas duras y blandas (*soft-templating* y *hard-templating*) para obtener materiales mesoporosos ordenados de sílice y de carbón con aplicaciones en biomedicina.

En la parte I de la presente tesis, los objetivos concretos planteados han sido:

- Encapsulación de células animales vivas en matrices de sílice porosa durante la síntesis sol-gel para el futuro desarrollo de órganos artificiales y biorreactores implantables (artículo I).
- Optimización de la dosificación de moléculas biológicamente activas desde matrices mesoporosas ordenadas de sílice a través del control de las interacciones *host-guest* para su aplicación como sistemas locales de liberación controlada que permitan ajustar la dosis a las necesidades clínicas concretas (artículos II y III).
- Evaluación del comportamiento de materiales mesoporosos ordenados de sílice frente a la infección mediante el estudio *in vitro* de la adherencia bacteriana sobre la superficie de biocerámicas (artículo IV).
- Evaluación del comportamiento mecánico a compresión de piezas tridimensionales de materiales mesoporosos ordenados de sílice conformadas con el polímero agarosa para su aplicación como relleno en defectos óseos que no hayan de soportar elevadas cargas (artículo V).

En la parte II de la presente tesis, los objetivos concretos planteados han sido:

- Síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbono mediante el método de nanomoldeo empleando materiales mesoporosos ordenados de sílice como plantillas “duras”, así como mediante autoensamblaje cooperativo de resinas poliméricas y surfactantes empleados como plantillas “blandas”.
- Caracterización físico-química de materiales mesoporosos ordenados de carbón sintetizados prestando especial atención a sus propiedades texturales y la polaridad de su superficie.
- Síntesis de hidroxiapatita porosa combinando el método de precipitación para la obtención de fosfatos de calcio con el método de nanomoldeo empleando materiales mesoporosos ordenados de carbono como plantilla.



PARTE I. BIOMATERIALES DE SÍLICE

I.1.- ESTADO DEL ARTE

El campo de los biomateriales ha experimentado una enorme evolución en los últimos cincuenta años debido al incremento en el número de pacientes con algún tipo de patología ósea como osteoporosis, fracturas ocasionadas por traumatismos asociados a accidentes o artritis, las cuales originan defectos óseos que necesitan tratamiento específico [1], todo ello debido fundamentalmente a la mejora de la calidad de vida y el aumento de la esperanza de vida en nuestra sociedad. Por este motivo, el desarrollo de materiales y dispositivos que permitan sustituir y regenerar el tejido óseo despierta un gran interés científico. Si bien es cierto que las situaciones en las que se utilizan los biomateriales hoy en día difieren enormemente de las de hace unas décadas, los sistemas implantables siguen teniendo una especial relevancia. Actualmente, las aplicaciones biomédicas de estos materiales abarcan un amplio rango de sistemas para la liberación de fármacos y genes, la ingeniería de tejidos, la terapia celular o los sistemas de diagnóstico, entre otros.

Respecto a las biocerámicas de sílice [2,3,4], la creciente demanda de biomateriales con propiedades específicas concebidos para la aplicación deseada, ha conducido al desarrollo de nuevas rutas de síntesis. En particular, la flexibilidad y versatilidad que ofrece el método sol-gel [5,6] para la obtención de sílice porosa, permite la incorporación de moléculas biológicamente activas e incluso la encapsulación de células vivas durante la síntesis, expandiendo así sus aplicaciones en biotecnología y biomedicina. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los materiales de sílice obtenidos por el método sol-gel son biocompatibles, bioactivos y no tóxicos [7,8,9]. Además, la combinación del proceso sol-gel con surfactantes o polímeros que actúan como agentes directores de estructura durante la síntesis da lugar a los denominados *materiales mesoporosos ordenados de sílice* [10]. Estos materiales presentan porosidad ordenada y homogénea en el rango de 2 a 20 nm [11], excelentes propiedades texturales [12] y la posibilidad de funcionalizar su superficie con diversos grupos orgánicos [13]. Estas características les convierten en buenos candidatos para su aplicación en la liberación controlada de fármacos [14,15,16,17,18], regeneración de tejido óseo [19,20,21], transfección génica [22,23], marcadores celulares [24] o la inmovilización de enzimas o proteínas [25,26,27].

En la parte I de la presente tesis, las aplicaciones biomédicas de los materiales porosos de sílice investigadas se dirigen, por un lado, hacia la encapsulación de células para su potencial uso en biorreactores implantables y órganos artificiales (artículo I). Y, por otro lado, hacia el diseño de sistemas para la liberación controlada de fármacos, con especial interés en el tratamiento de patologías óseas (artículos II y III). Asimismo, la aplicación biomédica de estos biomateriales como sistemas implantables, hace interesante la evaluación de su comportamiento frente a la infección bacteriana (artículo IV) así como el estudio de sus propiedades mecánicas a compresión (artículo V).

I.1.1.- SÍNTESIS DE MATERIALES POROSOS DE SÍLICE

I.1.1.1.- Proceso sol-gel

Los métodos tradicionales de síntesis de sólidos basados en tratamientos a elevada presión y/o temperatura tales como el método cerámico de preparación de óxidos o la obtención de vidrios por fusión, presentan ciertas desventajas. En cuanto a la reactividad, las lentas etapas de los procesos de difusión requieren la utilización de ciclos de calcinación largos y costosos. Por otro lado, mediante estos métodos no es posible acceder a la química de los compuestos que sólo son estables a bajas temperaturas. Así, los métodos de síntesis basados en la denominada *chimie douce* tratan de resolver estos inconvenientes [28].

El método sol-gel es una ruta de síntesis muy versátil. Se caracteriza por las bajas temperaturas a las que se sintetizan materiales inorgánicos e híbridos orgánico-inorgánico permitiendo la incorporación de especies orgánicas o incluso biológicas [5,6]. Esta ruta permite obtener materiales de gran pureza y homogeneidad a escala molecular así como controlar a escala nanométrica las superficies, interfases y porosidad de los materiales obtenidos. Por otro lado, el control del método de procesado permite variar la morfología de los materiales sintetizados y así obtener partículas [29], películas [30], monolitos [31] o fibras [32,33]. Todas estas características permiten obtener materiales con alto valor añadido.

El método sol-gel consiste en varias etapas que involucran procesos físicos y químicos tales como hidrólisis, polimerización, envejecimiento, secado y densificación. En la práctica, el proceso se puede iniciar a partir de la gelificación de soluciones coloidales o

a partir de la hidrólisis y condensación de sales inorgánicas o precursores organometálicos en agua o disolventes orgánicos. Los alcóxidos metálicos $M(OR)_n$, donde M es un átomo metálico y R es $-(CH_2)_x-CH_3$ son precursores ampliamente utilizados. En la etapa de hidrólisis se emplean catalizadores ácidos o básicos así como co-solventes que favorecen la miscibilidad del alcóxido y el agua. Las reacciones de hidrólisis y condensación de alcóxidos de silicio se muestran a continuación de manera esquemática:



Estas reacciones se producen simultáneamente en varios lugares de la mezcla de reactivos. Cuando en una región se forman suficientes enlaces Si-O-Si, responden cooperativamente como partículas coloidales nanométricas dando lugar a un sol. El tamaño de las partículas del sol y el grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas en su interior dependen del pH y de la relación $R = (\text{mol } H_2O / \text{mol } Si(OR)_4)$.

Así, en condiciones ácidas, un valor de $R = 1-2$ da lugar a estructuras poliméricas lineales y, por lo tanto, a materiales más densos [33]. Sin embargo, un valor de $R = 20-50$ da lugar a estructuras más ramificadas [34]. En general, los materiales obtenidos a pH ácido presentan estructuras más ramificadas y por lo tanto más porosas que los obtenidos a partir de soles básicos. Este concepto se muestra de manera esquemática en la Figura I.1.

A medida que progresa la hidrólisis y condensación de los precursores, aumenta la viscosidad del sol. Cuando las cadenas poliméricas creadas por las reacciones de condensación crecen hasta alcanzar dimensiones macroscópicas en el sol, se forman partículas coloidales que condensan entre ellas para dar lugar a una macromolécula gigante que se extiende por toda la disolución. Esta sustancia se dice que es un gel. Por lo tanto, un gel es una estructura tridimensional continua que encierra una fase líquida en su interior. La solución de los precursores antes de la gelificación se puede moldear con la forma deseada.

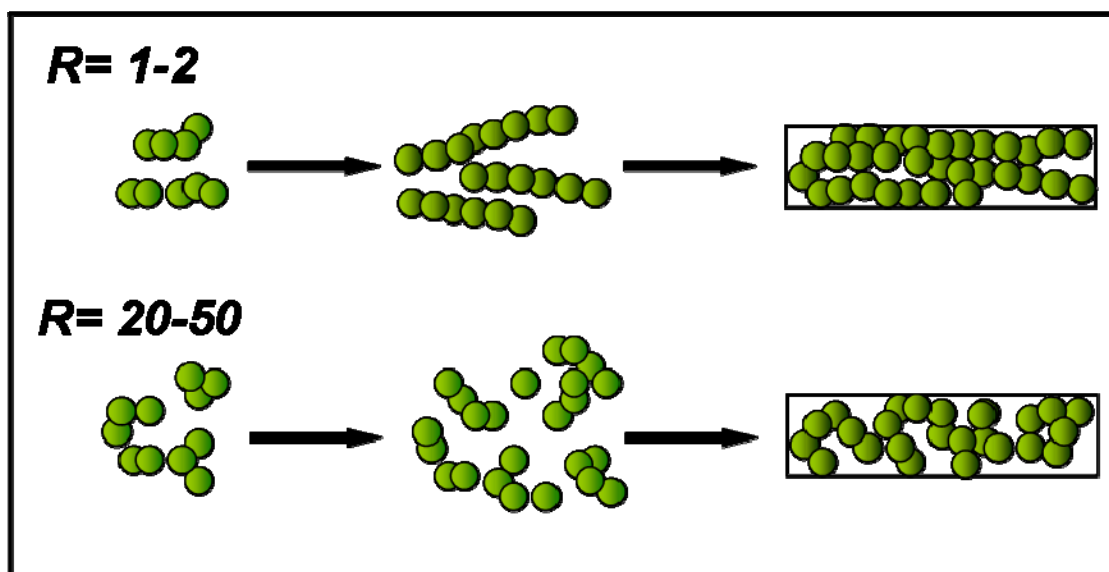


Figura I.1. Esquema de un sol con un valor de R pequeño ideal para obtener fibras (arriba), y con un valor de R elevado para obtener monolitos (abajo).

A medida que progresa la reacción, la policondensación continúa y aumenta la conectividad de la estructura. El efecto global del envejecimiento es el aumento de la rigidez y la contracción del gel. Finalmente, en el proceso de secado se elimina el líquido embebido en los poros del gel así como el agua y otros disolventes ocluidos en la red silícea. La evaporación desde dentro de los poros origina tensiones capilares que llevan frecuentemente a fractura, lo cual puede limitar muchas de sus aplicaciones. Por ello, se han desarrollado diversos métodos para evitar la fractura, entre ellos el secado hipercrítico, la evaporación lenta o la incorporación de aditivos.

La síntesis sol-gel a partir de alcóxidos se puede llevar a cabo en dos etapas modificando el pH, adaptación idónea para permitir la encapsulación de entidades biológicas. En una primera etapa a pH ácido se produce la hidrólisis del alcóxido precursor. Esta etapa se caracteriza por una velocidad de hidrólisis muy rápida y una velocidad de condensación lenta. La segunda etapa se inicia con la adición de base de manera que la velocidad de condensación aumenta, lo que en la práctica conduce a un aumento en la viscosidad del sol y finalmente a la gelificación. El valor de R del sol, la base utilizada y su concentración, la temperatura y la velocidad de agitación influyen en la velocidad de gelificación y juegan un papel importante en la estructura de los geles obtenidos.

Los materiales obtenidos por el método sol-gel presentan numerosas aplicaciones en su mayoría derivadas de la amplia variedad de posibilidades existentes para procesar los geles obtenidos. Algunas incluyen elementos ópticos, aislantes, recubrimientos, superconductores de alta temperatura, fibras de refuerzo o catalizadores [35]. Además, la incorporación de especies biológicamente activas en estas matrices permite desarrollar materiales con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. Así, las especies pueden permanecer inmovilizadas para dar lugar a biorreactores o biosensores [36,37,38] o bien pueden ser liberadas al medio circundante actuando como sistemas de liberación controlada de biomoléculas [39,40,41]. Las aplicaciones biomédicas de estos materiales [42] se comentarán en detalle más adelante en esta memoria.

I.1.1.2.- Materiales mesoporosos ordenados

De acuerdo con la definición de la IUPAC [11], los materiales porosos se clasifican en función del tamaño de poro en: microporosos (< 2 nm), mesoporosos (2 - 50 nm) y macroporosos (> 50 nm). La Figura I.2 muestra la distribución de tamaños de poro de distintos tipos de materiales porosos de acuerdo con esta clasificación. Con frecuencia se habla de materiales nanoporosos. Sin embargo, este término no está definido claramente y se refiere de manera genérica a materiales con poros del tamaño de nanómetros.

Desde los años sesenta se han utilizado aminos cuaternarios como plantillas orgánicas para la síntesis de zeolitas [43], aluminosilicatos cristalinos microporosos ampliamente utilizados en catálisis, separación, adsorción e intercambio iónico [44,45]. A pesar de sus excelentes propiedades texturales, el pequeño tamaño de poro de estos materiales limita sus aplicaciones en procesos tecnológicos en los que se obtienen productos de alto valor añadido y que involucran moléculas de gran tamaño. A principios de los años noventa, la síntesis de una nueva familia de materiales mesoestructurados a partir de surfactantes como agentes directores de estructura para el autoensamblaje y la condensación de los precursores inorgánicos, supuso una verdadera revolución en el campo de los materiales porosos. Desde el punto de vista histórico, si bien la primera síntesis de un material mesoporoso ordenado fue ya patentada en el año 1969 [46,47], la estructura, por la falta de análisis, no fue reconocida hasta que en 1991 investigadores japoneses [48] y de la compañía Mobil Oil Co. [10] sintetizaron y describieron de

manera independiente la estructura la familia de materiales mesoestructurados de base sílicea KSW-n y M41S, respectivamente.

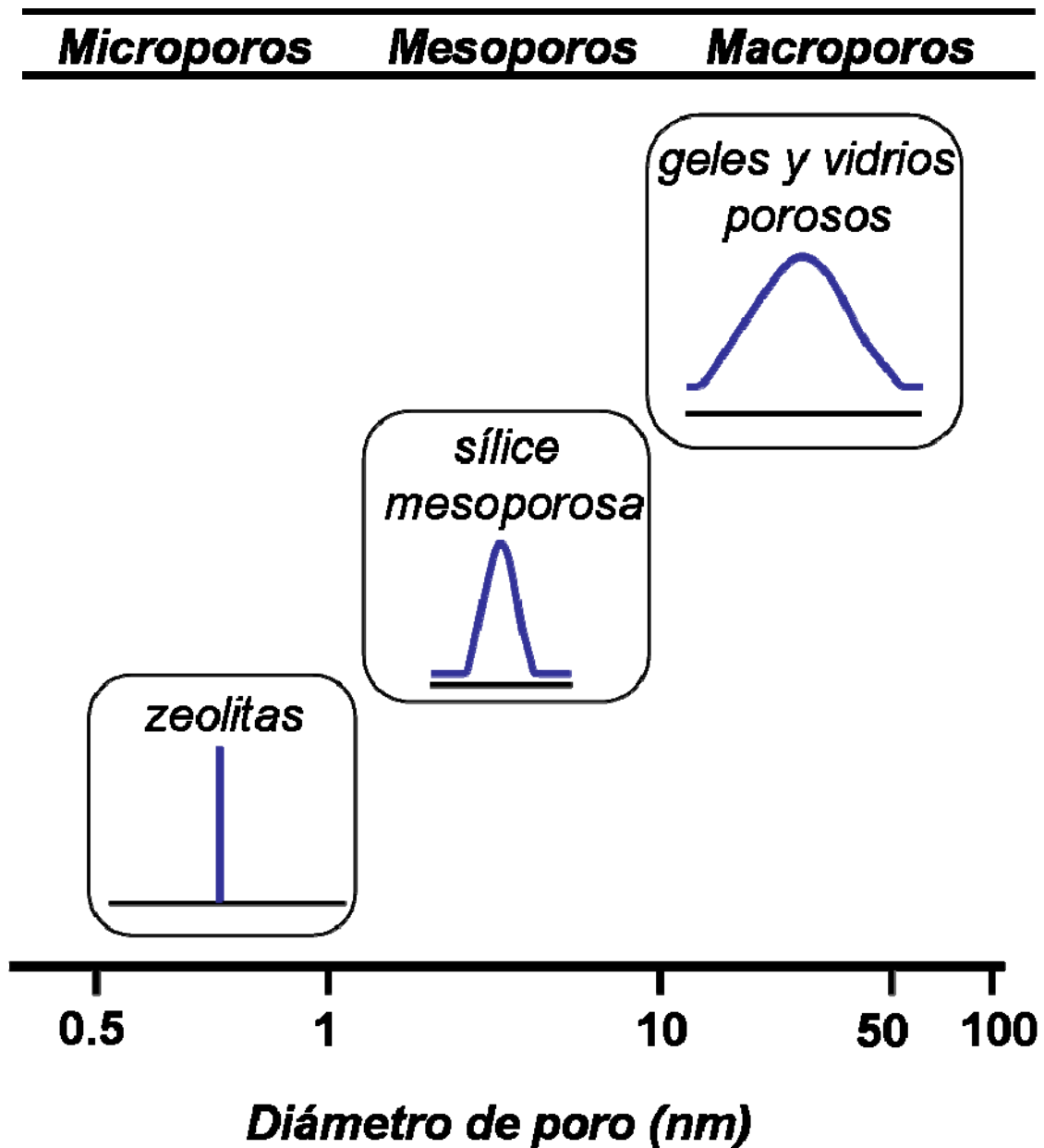


Figura I.2. Distribución de tamaños de poro de materiales micro-, meso- y macro- porosos de sílice. Adaptada de la referencia [49].

Tras la eliminación del surfactante empleado como plantilla durante la síntesis, se obtienen materiales con excelentes propiedades texturales como son elevada superficie específica (*ca.* 1000 m²/g), distribución de diámetro de poro muy estrecha y elevado volumen de poro (*ca.* 1 cm³/g). Una comparación entre distintas familias de materiales inorgánicos con elevada superficie específica muestra que, mientras que los geles de sílice obtenidos por el método sol-gel presentan una estructura porosa completamente

desordenada, las zeolitas son sólidos totalmente cristalinos y los denominados materiales mesoporosos ordenados son “cristalinos” a escala mesoscópica pero amorfos a escala atómica.

Hoy en día existen dos aproximaciones sintéticas para la obtención de materiales mesoporosos ordenados de base silícea. Por un lado, la ruta de precipitación, empleada en la primera síntesis de materiales mesoestructurados. Por otro lado, el denominado autoensamblaje inducido por evaporación (*evaporation induced self-assembly, EISA*) [50,51]. Como ejemplo de esta segunda ruta, la incorporación de agentes directores de estructura en la síntesis de vidrios ha permitido obtener materiales multicomponentes en los sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ y $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ (vidrios con plantilla o *templated glasses*), que demuestran un comportamiento bioactivo excelente *in vitro* en comparación con los vidrios convencionales [52,53]. La presente introducción de tesis se centra en la ruta de precipitación ya que, aunque existen rutas alternativas más versátiles, es una manera sencilla, directa y eficaz de sintetizar materiales mesoporosos ordenados de sílice.

Para una mejor comprensión del mecanismo de formación de estos materiales mesoestructurados, es interesante introducir brevemente algunas consideraciones básicas sobre los surfactantes empleados como plantilla durante la síntesis. Los surfactantes o tensioactivos son moléculas anfifílicas, con al menos un grupo polar como cabeza hidrófila y un grupo apolar como cola hidrófoba, ambos bien diferenciados. En medio acuoso y por encima de la temperatura de *Kraft* [54], esta característica induce la organización supramolecular o autoensamblaje de estas moléculas en micelas al alcanzarse la concentración micelar crítica (*cmc*). Los surfactantes se pueden clasificar según la estructura química del grupo polar en iónicos (catiónicos y aniónicos), no iónicos y neutros. A medida que la concentración del surfactante aumenta, y en función de las condiciones de síntesis, la variación gradual de la curvatura de la interfase origina fases con distintas geometrías. Existe un modelo basado en consideraciones geométricas relacionadas con la superficie de la cabeza polar y el volumen de la parte hidrófoba que explica y predice estas estructuras autoensambladas [55]. De este modo, la forma de la micela viene determinada por la forma de la molécula anfifílica que da lugar a ella. En las condiciones apropiadas, las micelas se empaquetan para formar superestructuras ordenadas. Esta idea se muestra de manera esquemática en la Figura I.3.

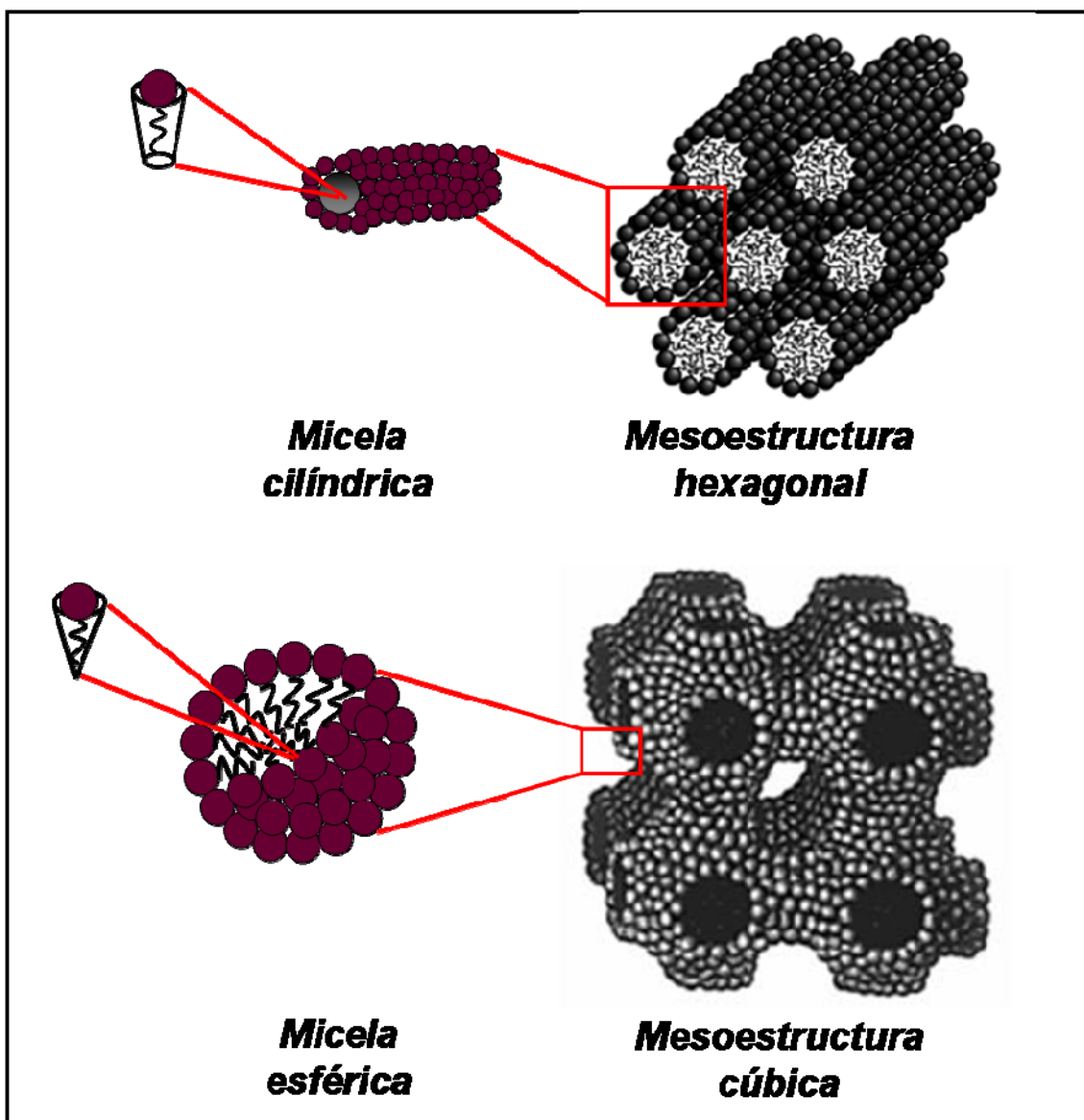


Figura I.3. Esquema de algunas estructuras micelares. Influencia de la geometría de las moléculas de surfactante en la formación de micelas y la geometría del empaquetamiento final. Adaptado de la referencia [56].

En cuanto al mecanismo de síntesis de materiales mesoporosos ordenados, se postulan dos procesos. En un primer momento se propuso el modelo de cristal líquido [10,57] (*liquid crystal templating mechanism, LCT*) en el que la estructura viene definida por la organización de las moléculas de surfactante en fases de tipo cristal líquido mesoestructuradas sobre las que se deposita la fase inorgánica y que implica concentraciones de surfactante superiores a la *cmc*. Más adelante, se planteó el mecanismo de autoensamblaje cooperativo (*cooperative liquid crystal templating, silicate-initiated, CLCT*) [58]. En este caso, es la interacción entre las moléculas del surfactante y los precursores inorgánicos presentes en el medio la que induce el

ensamblaje de la mesofase. Este es el mecanismo comúnmente aceptado, aunque se hayan sugerido pequeñas variaciones [59]. El mecanismo de síntesis de materiales mesoporosos ordenados mediante el modelo de cristal líquido se representa de manera esquemática en la Figura I.4. En función de las interacciones entre las moléculas de surfactante, la especie inorgánica y los iones presentes en el medio, se pueden distinguir diferentes mecanismos de formación de estructuras mesoporosas [60]. Así, si la reacción tiene lugar en condiciones básicas ($\text{pH} > 2$), las especies de sílice estarán presentes como aniones:

- Si se usan surfactantes catiónicos (*i.e.* sales de amonio cuaternario), el mecanismo se denomina S^+I^- , (S: surfactante; I: especie inorgánica).
- Si el surfactante es aniónico (*i.e.* fosfatos de cadena larga), se necesita un ión mediador M^+ para asegurar la interacción entre ambas especies cargadas negativamente, el mecanismo es $\text{S}^-\text{M}^+\text{I}^-$, (M^+ : Na^+ , K^+).

Por otro lado, si la reacción tiene lugar bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 2$), las especies de sílice estarán positivamente cargadas:

- Con surfactantes catiónicos, es necesario añadir un ion mediador X^- (habitualmente un haluro), mecanismo $\text{S}^+\text{X}^-\text{I}^+$, (X^- : Cl^- , Br^-).
- Con surfactantes aniónicos, no es necesario mediador, mecanismo S^+I^+ .

En lo expuesto hasta el momento, las interacciones orgánico-inorgánico predominantes entre el surfactante y la red de sílice son de naturaleza electrostática. No obstante, es posible que las interacciones atractivas estén mediadas por enlaces de hidrógeno o sean de naturaleza dipolar. Es en este caso cuando se utilizan surfactantes no iónicos (*i.e.* *Brij*s[®] o *Pluronic*s[®]) o neutros (N^0 : polióxido de etileno, S^0 : aminas de cadena larga) con especies de sílice no cargadas, mecanismos S^0I^0 , N^0I^0 o pares iónicos $\text{S}^0(\text{XI})^0$ [61].

La versatilidad de esta ruta permite controlar el tamaño de poro a través de la elección del tipo del surfactante, la incorporación de aditivos orgánicos y la modificación de las condiciones de síntesis (pH, temperatura, concentración de surfactante, etc.) [62,63,64,65], así como obtener sólidos mesoporosos ordenados según distintas estructuras: hexagonal ($p6m$), cúbica ($Ia3d$, $Im3m$, $Fm3m$) o laminar, entre otras. Incluso se ha descrito la preparación de sílice mesoporosa quiral mediante el empleo de

surfactantes de origen biológico [66]. Algunos ejemplos de estructuras mesoporosas sintetizadas comprenden las familias MCM (Mobil Composition of Matter) [10], SBA (Santa Barbara) [67], MSU-n (Michigan State University) [68], KIT-n (Korea Advanced Institute of Science and Technology) [69], FSM-n (Folded Sheet Materials) [48,70], FDU (FuDan University) [71] y AMS-n (Anionic surfactante templated Mesoporous Silica) [72]. En la Figura I.5 se muestra la modelización tridimensional de varias estructuras de materiales mesoporosos de sílice ordenados, junto con su diámetro de poro y simetría cristalina.

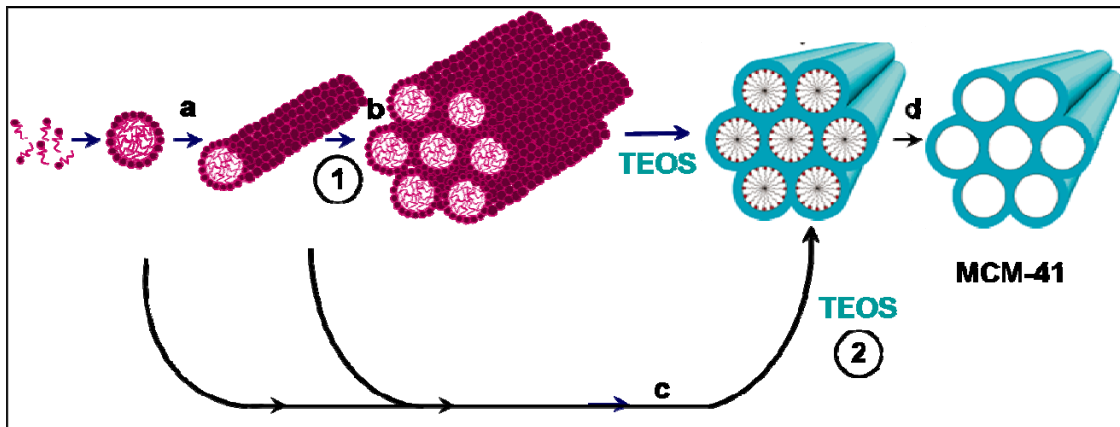


Figura I.4. Esquema de mecanismo de síntesis de materiales mesoporosos ordenados de sílice mediante el modelo de cristal líquido; (1) TLCT y (2) CLCT (cooperativo). Las etapas son (a) formación de micelas cilíndricas de surfactante, (b) organización hexagonal de micelas cilíndricas, (c) formación de la capa de sílice y (d) eliminación del surfactante. Adaptado de la referencia [44].

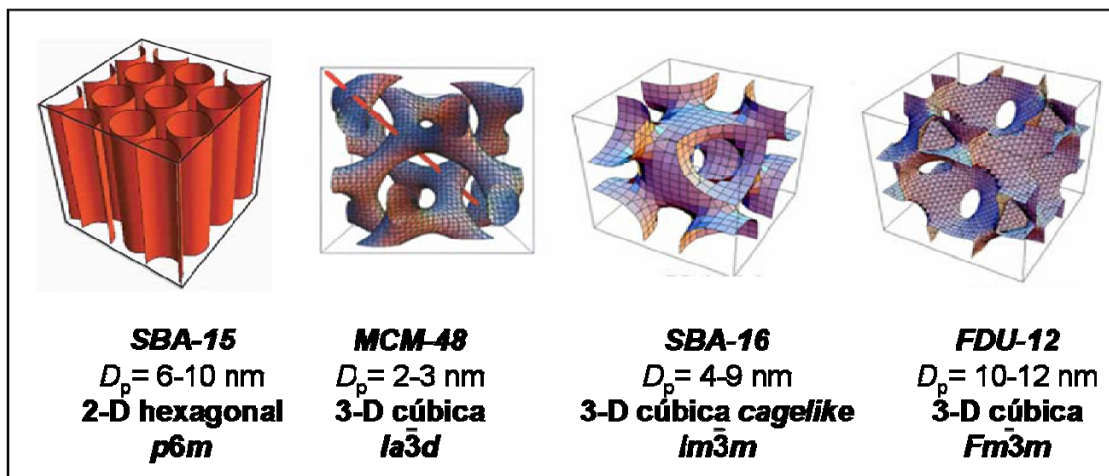


Figura I.5. Estructura cristalina de materiales mesoporosos ordenados. Adaptada de referencia [73].

Independientemente de la ruta sintética utilizada, la última etapa en la síntesis de los materiales mesoporosos ordenados conlleva la eliminación del surfactante orgánico mediante tratamiento térmico (calcinación) o métodos de extracción química. El proceso de calcinación suele llevarse a cabo con rampas de calentamiento lentas hasta alcanzar los 550 °C. Este tratamiento influye en la estabilidad de las paredes inorgánicas debido a la condensación de la matriz, pudiendo originar distorsiones y grietas por contracción de la estructura. Las alternativas de baja temperatura consisten en la extracción mediante lavado a reflujo con disolventes o fluidos supercríticos [74,75,76], la digestión microondas (< 200 °C) [77] o en el tratamiento oxidativo con ozono [78]. Sin embargo, en comparación con el proceso de calcinación, estos métodos no consiguen eliminar por completo el surfactante y por ello suelen venir acompañados de una calcinación final en condiciones suaves. Las paredes de sílice que separan los poros en estos materiales son amorfas y están repletas de defectos estructurales como resultado de la condensación incompleta de los átomos de silicio tras la hidrólisis, lo que origina la presencia de átomos de silicio unidos a grupos OH, es decir, grupos silanol (Si-OH) en las paredes. La eliminación del surfactante por calcinación fomenta la condensación de grupos silanol. Sin embargo, los procesos de extracción minimizan la pérdida de OH en la superficie, lo cual es de gran interés para la posterior funcionalización orgánica de las matrices con agentes sililantes, tal y como se discute más adelante.

La estabilidad hidrotermal, térmica y mecánica de estos materiales son aspectos en los que el espesor de la pared de poro [79] y el precursor silíceo empleado influyen decisivamente. Se puede aumentar la estabilidad frente al agua mediante adición de sales durante la síntesis, tratamiento hidrotermal, mediante hidrofobización de la superficie o incorporación de heteroátomos en la red [80,81,82].

En cuanto a la morfología de los materiales obtenidos a escala macroscópica, los métodos tradicionales de precipitación suelen generar polvo de morfología irregular. Sin embargo, es posible obtener partículas de morfología esférica [83,84,85], así como fibras [86,87] o láminas [88] variando las condiciones de síntesis y la técnica de procesado (*dip-coating*, *aerosol deposition*, *EISA*, etc.) [89,90].

Recientemente, se ha demostrado que mediante la utilización de energía microondas la velocidad de precipitación en la síntesis de sílice mesoporosa puede acortarse reduciendo así los tiempos de reacción [91].

En los últimos años, se ha hecho un gran esfuerzo para extender la familia de los mesoporosos a materiales no silíceos tales como óxidos (ZrO_2 , Nb_2O_5 , TiO_2) o fosfatos de metales de transición, aluminio o estaño [92,93,94,95]. Sin embargo, la elevada reactividad de los alcóxidos de metales de transición hace que la síntesis no sea fácil de controlar. Además, la eliminación de la plantilla conlleva frecuentemente el deterioro o colapso del sólido poroso dado el elevado grado de condensación de la red inorgánica, no tan flexible como en el caso de los materiales silíceos. Por lo general, los materiales basados en óxidos de metales de transición son sensibles a reacciones redox, hidrólisis y transformaciones de fase y, con frecuencia, las altas temperaturas requeridas para eliminación del surfactante favorecen la formación de sólidos cristalinos no porosos. Como alternativa, la sustitución isomórfica de algunos átomos de silicio de la estructura por otros metales lleva a la formación de materiales mesoporosos equivalentes que, manteniendo la estructura, adquieren propiedades específicas en función del heteroátomo incorporado [96]. Otra alternativa consiste en emplear materiales mesoporosos ordenados de base silícea como plantillas rígidas e introducir en sus poros platino o carbono. Tras la disolución de la sílice, se obtiene un material mesoporoso de platino o carbono como réplica inversa de la estructura de partida [97,98]. A continuación es posible emplear este material de nuevo como molde, pudiendo eliminarse con posterioridad. Así se han obtenido nanohilos y nanopartículas de distintos metales [99]. Estas estrategias pueden encuadrarse dentro del denominado nanomoldeo o *repeated templating* [100], las cuales se discutirán con más detalle en la parte II de la presente tesis.

Otro reto en la investigación actual es la obtención de sólidos jerarquizados con estructuras definidas a varios niveles: macroscópico, mesoscópico y molecular [101], permitiendo combinar propiedades emergentes de varias dimensiones. Varias de las posibilidades sintéticas comentadas en estos párrafos se muestran de manera esquemática en la Figura I.6.

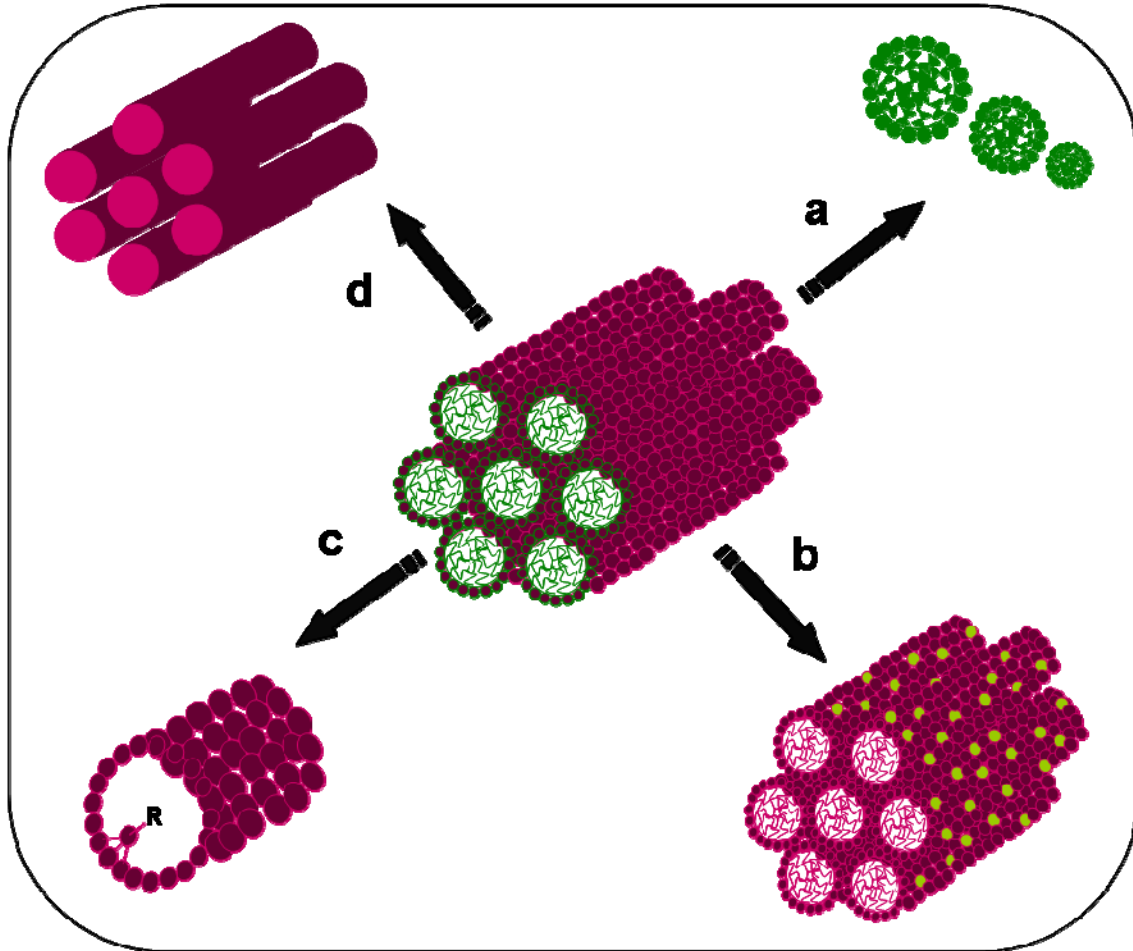
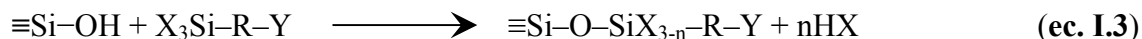


Figura I.6. Resumen de posibilidades sintéticas de sílices mesoporosas ordenadas obtenidas por autoensamblaje de surfactantes: (a) control del tamaño de poro, (b) sustitución isomórfica de silicio por otros metales, (c) funcionalización de la superficie con organotrialcóxidos y (d) empleo de la sílice mesoporosa como plantilla para fabricación de carbón o nanohilos de metales. Adaptada de la referencia [102].

I.1.2.- FUNCIONALIZACIÓN DE MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS DE SÍLICE

Una de las estrategias empleadas para modificar las propiedades físico-químicas de los materiales mesoporosos ordenados de sílice es la incorporación de componentes orgánicos en su superficie, en su estructura, o atrapados en sus canales [13]. De esta manera se puede controlar el tamaño de poro y las propiedades de la superficie, así como proporcionar a los materiales una mayor estabilidad térmica, mecánica o estructural, todo ello en vistas a aplicaciones concretas. En particular, nos referiremos a la modificación con agentes sililantes portadores de especies orgánicas que reaccionan con los grupos silanol de la superficie, tanto interna como externa. De esta forma, se

emplea una especie química del tipo Si-R, donde R representa un radical orgánico que se une de manera covalente al átomo de oxígeno del grupo silanol, Si-OH, formando enlaces del tipo Si-O-R tal y como se muestra a continuación:



donde X = átomo de halógeno, generalmente Cl, o grupo alcóxido, como etóxido o metóxido; R = cadena alquílica; Y = OH, SH, NH₂, SO₃H, Cl, F, Ph, etc.

Existen dos estrategias principales para funcionalizar la superficie de materiales porosos de sílice. Ambas se representan de manera esquemática en la Figura I.7. Por un lado, el método de co-condensación consiste en la reacción entre un tetra-alcoxisilano (Si-OR₄) y uno o más organosilanos (OR₃-Si-R') que contienen al menos un enlace Si-C. En este método el precursor del grupo funcional se incorpora al gel de síntesis desde el principio y se produce la hidrólisis conjunta de los precursores del esqueleto inorgánico de sílice y del alcóxido de silicio. Así se obtienen materiales mesoporosos funcionalizados en una sola etapa en los que los grupos orgánicos son componentes directos de la pared silíceas y están proyectados hacia el exterior. Se consigue una funcionalización homogénea ya que los grupos orgánicos se distribuyen uniformemente en los canales. Además, permite ejercer un buen control en la cantidad de grupos funcionales incorporados en la estructura. Sin embargo, no es conveniente excederse con la concentración de agente funcionalizante ya que puede ocasionar una disminución en el orden de la estructura obtenida. Finalmente, la eliminación del disolvente se suele llevar a cabo por extracción química con disolventes para evitar dañar los grupos funcionales incorporados.

Un método alternativo de funcionalización es el método post-síntesis, también denominado método de anclaje. En este caso se hace reaccionar el alcóxido de silicio con el material mesoporoso previa eliminación del surfactante. De esta manera, todos los grupos funcionales incorporados están anclados y expuestos hacia el exterior. Mediante el anclaje post-síntesis, los materiales presentan estructuras más definidas y mayor resistencia a la hidrólisis, permitiendo además un control más sencillo del tamaño de poro [103]. No obstante, si los agentes sililantes reaccionan preferentemente a la entrada de los poros o autocondensan, la difusión hacia el centro de los canales puede verse impedida. Esto conlleva una distribución poco homogénea de los grupos

orgánicos y un bajo grado de ocupación. Para evitar estos inconvenientes las reacciones de funcionalización se llevan a cabo en condiciones anhidras. Asimismo, se ha estudiado el uso de catalizadores en medio polar para aumentar la cantidad de grupos orgánicos incorporados [104,105].

De acuerdo con este método, existe una subclasificación complementaria atendiendo a la reactividad de los grupos funcionales anclados. Así se puede distinguir:

- modificación primaria en la que se hace reaccionar un agente sililante con la superficie de la sílice en un disolvente apropiado, bajo reflujo y en condiciones anhidras.
- modificación secundaria y de mayor orden que consiste en posteriores reacciones de las especies previamente ancladas para dar lugar a nuevas funcionalidades. También es posible bifuncionalizar la superficie con dos tipos de grupos orgánicos distintos [106,107,108] para el diseño materiales con nuevas aplicaciones.

Asimismo, el anclaje se puede llevar a cabo con grupos pasivos o reactivos. Los grupos pasivos poseen una reactividad baja como por ejemplo cadenas alquílicas o grupos fenilo, o bien son muy voluminosos de manera que no reaccionen con otras especies químicas. La elección adecuada de estos grupos permite controlar el tamaño de poro, o bien aumentar la estabilidad hidrotermal de la sílice tras hidrofobizar la superficie o pasivar grupos silanol. Por otro lado, los grupos superficiales reactivos tales como olefinas, grupos vinílicos, nitrilos o alquitioles son capaces de seguir reaccionando mediante boración, hidrólisis u oxidación y así dotar a la estructura de nuevas funcionalidades [109].

El denominado *anclaje selectivo* es una herramienta muy útil. Por lo general, la superficie externa del material es más accesible que la superficie interna de los canales. De este modo, los grupos funcionales anclados en el exterior son de nuevo más accesibles a sucesivas reacciones. Esto puede ser un inconveniente si se pretende aprovechar la estructura porosa para llevar a cabo reacciones en el interior. La solución entonces está en pasivar la superficie externa [98,110,111]. Asimismo es posible funcionalizar la superficie tanto externa como interna con grupos protectores de manera que podamos desproteger de manera selectiva, por ejemplo, tan sólo los grupos externos

para hacerlos reaccionar de nuevo [112]. También es posible evitar completamente la funcionalización de la superficie interna [113].

Las excelentes propiedades texturales y estructurales de los materiales mesoporosos ordenados de sílice junto con la posibilidad de modificar químicamente su superficie permite desarrollar multitud de aplicaciones [12,114]. En particular, estos materiales se emplean en catálisis heterogénea, sensores, láseres, filtros de luz o células solares [115]. Asimismo, se utilizan para eliminar o almacenar contaminantes tales como núcleos radiactivos, metales pesados tóxicos o compuestos orgánicos. Estos materiales también presentan interesantes aplicaciones en biomedicina [18], tal y como se detalla a continuación.

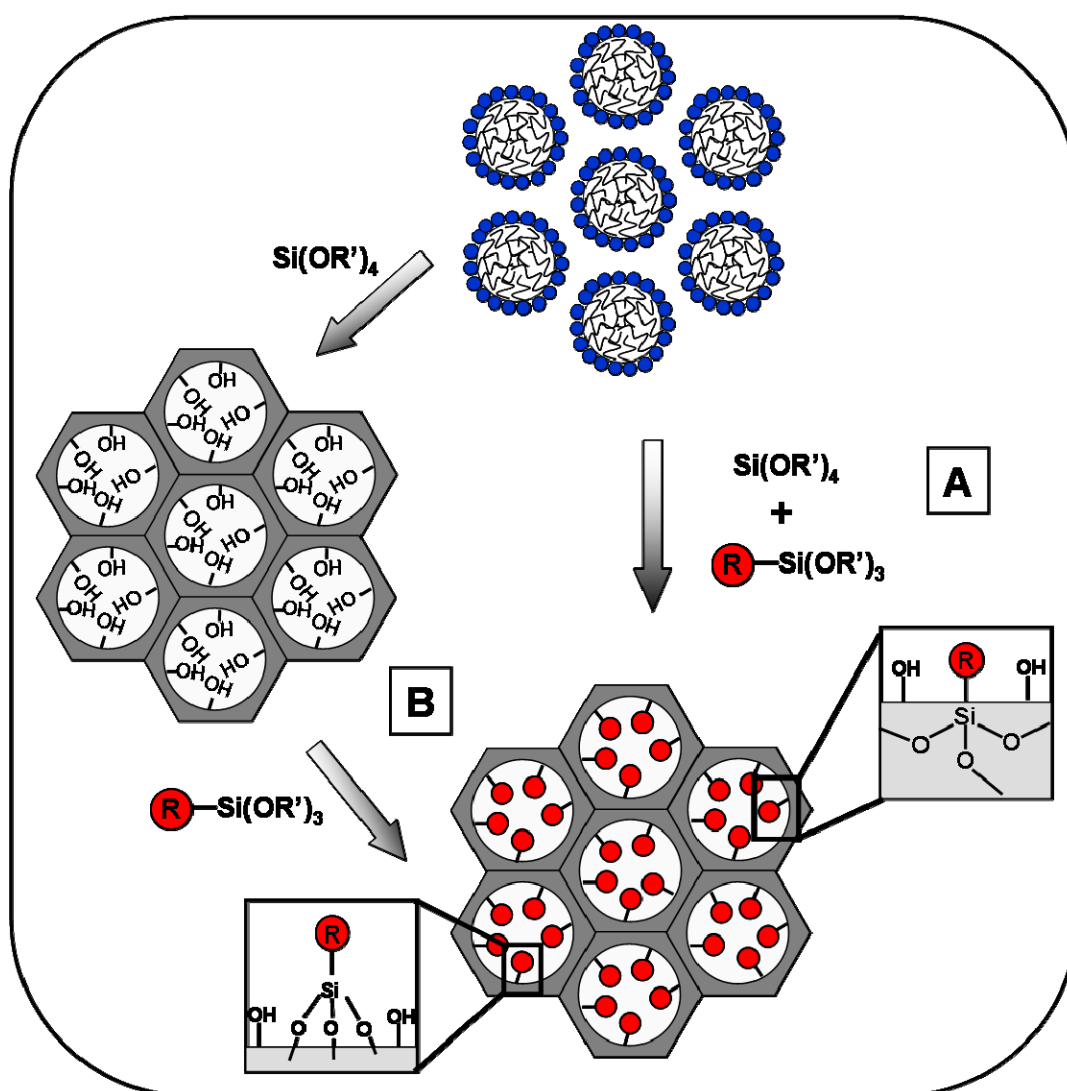


Figura I.7. Esquema de los métodos de funcionalización de materiales mesoporosos de sílice (a) co-condensación y (b) post-funcionalización.

I.1.3.- BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE MATERIALES POROSOS DE SÍLICE

La aplicación de los materiales porosos de sílice como sistemas de liberación de fármacos tanto orales como implantables implica el contacto con el medio fisiológico. Mientras que en el primer caso se requiere no toxicidad, en el segundo caso estos materiales actúan como biomateriales, por lo que además han de ser biocompatibles.

La definición de biocompatibilidad ha evolucionado en las últimas décadas como consecuencia del gran desarrollo que el campo de los biomateriales y sus aplicaciones ha experimentado. Hoy en día, la biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para cumplir su función en una aplicación específica con una respuesta apropiada por parte del tejido [116]. De una manera más amplia, la biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para cumplir su función terapéutica sin producir efectos indeseados, sean locales o sistémicos, en el beneficiario del tratamiento, pero sí originando la respuesta más apropiada a nivel celular o tisular en esa situación concreta, optimizando así el efecto terapéutico beneficioso más relevante de dicho tratamiento [117]. Según esta definición, el biomaterial no sólo ha de evitar producir efectos no deseados, sino que también ha de inducir una respuesta adecuada por parte del organismo para poder así desempeñar su función de la manera más apropiada posible.

La biocompatibilidad es una condición *sine qua non* que todo biomaterial ha de cumplir. Un buen punto de partida es estudiar la posible toxicidad derivada de su composición química. En lo que a la sílice se refiere, se sabe que la inhalación de sílice cristalina, en particular cuarzo, puede ocasionar graves enfermedades respiratorias [118]. Sin embargo, la sílice amorfa obtenida por el método sol-gel se considera no tóxica, biocompatible y biodegradable [119,120,121]. De hecho la sílice coloidal y la sílice porosa se emplean como adyuvantes en tecnología farmacéutica y en elementos de diagnóstico en investigación biomédica. Hasta la fecha se han descrito un gran número de estudios sobre la biocompatibilidad y la estabilidad de diversos materiales de sílice en forma de recubrimientos o como nanopartículas [7,8,122,123,124]. Sin embargo, es preciso prestar más atención a la evaluación de la inherente capacidad de degradación, la citotoxicidad y la biocompatibilidad de los materiales porosos de sílice y, en especial, de los materiales mesoporosos de sílice. Así, se sabe que tanto la concentración, el

tamaño de partícula, la superficie específica y la funcionalización de la superficie de la sílice mesoporosa juegan un papel fundamental en su toxicidad *in vitro* [22,125]. En cuanto al efecto de la concentración, estos materiales presentan poca toxicidad a concentraciones bajas [23,24] y elevada toxicidad a concentraciones altas [22,126]. Por otro lado, se sabe que nanopartículas de al menos 110 nm son internalizadas por las células sin efectos tóxicos [127]. Se ha demostrado que una superficie específica elevada puede producir efectos tóxicos [128] y que la funcionalización orgánica de la matriz conduce a una mejora de la biocompatibilidad [129,130,131]. Además, la incorporación en estas matrices de agentes osteogénicos que promuevan la regeneración de tejido óseo se considera una estrategia adecuada para acelerar el proceso de integración óseo y mejorar la biocompatibilidad [130].

En esta discusión se parte de la premisa de que los factores que afectan a la toxicidad *in vitro* y a la biocompatibilidad de estas biocerámicas, afectan también a su comportamiento *in vivo*. De hecho, en lo que respecta al efecto de su concentración *in vivo*, se ha observado baja toxicidad a pequeñas concentraciones [132] y respecto al tamaño, partículas mesoporosas de 100 nm han mostrado baja toxicidad al ser administradas vía intravenosa [133]. Estudios *in vivo* han demostrado que la incorporación de péptidos osteoinductores en matrices mesoporosas ordenadas de sílice reduce la encapsulación con tejido fibroso y promueve la formación de hueso [134]. Por otro lado, parece que la dosis y la vía de administración influyen en la respuesta del organismo a estos materiales, tal y como demuestran ensayos *in vivo*. Así, la inyección subcutánea de materiales mesoporosos ordenados de sílice conduce a una respuesta positiva mientras que la inyección intraperitoneal o intravenosa resulta tóxica y letal como resultado de la formación de trombos en el torrente sanguíneo, lo que conduce generalmente a embolia [135]. Los autores de este estudio sugieren que la toxicidad observada podría ser mitigada mediante la adsorción de proteínas, grupos funcionales o polímeros en la superficie de los materiales. Este aspecto se puede relacionar con la cantidad de sílice que la matriz mesoporosa libera hacia los fluidos fisiológicos que la rodean, siendo el valor de la concentración de SiO₂ en plasma humano alrededor de 1 mg/ml [136]. La biodegradación de la sílice *in vivo* se produce principalmente por disolución en los fluidos biológicos. Esta sílice disuelta como ácido silícico se excreta en la orina, lo cual contribuye al interés en el empleo de las matrices silíceas en aplicaciones biomédicas [137,138]. La biodegradación de la sílice obtenida por el

método tradicional sol-gel se puede controlar a través de la variación del contenido en agua [139,140] o de la porosidad mediante el empleo de aditivos durante la síntesis. En general, el control de la velocidad de degradación de la matriz silícea en función de la aplicación es siempre interesante [34,39]. El aumento de la estabilidad de estos materiales mediante la incorporación de heteroátomos en la red de sílice [141,142] o mediante la funcionalización de su superficie [143], permite disminuir la lixiviación de la sílice al medio circundante y mantener su concentración por debajo de niveles tóxicos.

Ya que la reactividad de un sólido comienza en su superficie, es imprescindible estudiar la interacción del material a implantar con los fluidos fisiológicos. Como resultado de la respuesta inflamatoria y la actuación del sistema inmune, la secuencia de reacciones biológicas desencadenada cuando un material se pone en contacto con la sangre lleva, en la mayoría de los casos, a la formación de una cápsula fibrosa alrededor del material que lo aísla como a un cuerpo extraño. Esta cápsula supone una barrera para que un sistema de liberación de fármacos implantable pueda cumplir su función. De este modo, la osteointegración es imprescindible en los sistemas de liberación controlada que actúan como implantes en injertos o rellenos óseos [144].

A comienzos de los años setenta se demostró que ciertas composiciones de vidrios de base silícea empleados como biomateriales eran capaces de unirse espontáneamente al hueso mediante la formación de una capa de tipo apatita, componente inorgánico del hueso, sin observarse formación de cápsula fibrosa alrededor del material implantado [145,146]. A este fenómeno se le denominó *bioactividad*. Los materiales mesoporosos ordenados de sílice están formados por una estructura tridimensional de sílice con grupos silanol en la superficie, tanto externa como interna. Estos grupos gobiernan la interacción con los fluidos fisiológicos, al igual que ocurre en los vidrios bioactivos [42,53]. Así pues, estas biocerámicas son bioactivas, lo que les permite ser aplicadas en regeneración ósea. La formación de la capa de apatita en la superficie también modifica la cinética de liberación de biomoléculas adsorbidas, sin embargo, constituye una ventaja frente a sistemas poliméricos ya que durante el proceso de liberación se produce tanto la degradación de la matriz como el crecimiento de nuevo hueso en el lugar del implante. El estudio del comportamiento bioactivo *in vitro* de los materiales SBA-15, MCM-41 y MCM-48 ha demostrado que la densidad de grupos silanol es un factor

clave en el tiempo de respuesta bioactiva [147]. Para acelerar tal respuesta bioactiva se han ideado estrategias basadas en el dopado con fósforo [148] y la mezcla con vidrio bioactivo [149].

I.1.4.- APLICACIONES BIOMÉDICAS DE MATERIALES POROSOS DE SÍLICE

I.1.4.1.- Evolución histórica de los materiales porosos de sílice en el campo de las aplicaciones biomédicas

De manera histórica, el interés por la inmovilización de especies biológicamente activas en soportes sólidos surge, a principios de los años noventa, de la necesidad de estabilizar dichas especies para su empleo en la industria biotecnológica. Desde entonces, se han descrito numerosas técnicas de inmovilización como la adsorción física, la unión covalente o la encapsulación. En muchos casos, las especies biológicamente activas tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, bacterias, hongos, células animales o vegetales, no pueden ser utilizadas directamente ya que son muy sensibles a las condiciones del medio. Por ello, han de ser inmovilizadas y estabilizadas a través de su encapsulación en una matriz adecuada. De esta manera, es posible emplear la actividad biológica de estas especies, especialmente la de las células, para el diseño de materiales funcionales con aplicaciones en biomedicina.

Los sistemas más ampliamente utilizados tanto en encapsulación celular como en la liberación controlada de fármacos han sido los sistemas poliméricos [150,151,152,153,154]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las matrices síliceas obtenidas por el método sol-gel poseen ciertas ventajas que permiten asegurar tanto el control en la liberación como la viabilidad de las especies celulares encapsuladas. Cabe destacar la mayor estabilidad química y mecánica de la sílice, la posibilidad de controlar su degradación [34], el medio acuoso biológicamente inerte que los geles de sílice proporcionan [155] y el hecho de que la sílice no represente una fuente de nutrientes para microorganismos. A estos aspectos hay que añadir las ventajas derivadas de la versatilidad y flexibilidad del proceso sol-gel.

No obstante, si bien el método sol-gel se considera *per se* como una ruta prometedora en el diseño de nuevos materiales con aplicaciones en biotecnología, el salto al campo

biomédico puede resultar complicado. La principal razón que conduce a pensar de esta manera es el hecho de que actualmente haría falta más información en relación a la biocompatibilidad de los materiales sol-gel, lo que podría limitar sus aplicaciones *in vivo* [156]. Cualquier material que sea diseñado con objeto de ejercer una función en contacto con el organismo vivo ha de ser biocompatible y no presentar ningún tipo de toxicidad, ya que va a interaccionar con fluidos fisiológicos. Así, tal y como se ha explicado anteriormente, las investigaciones descritas hasta el momento han puesto de manifiesto la necesidad de continuar investigando en aspectos relacionados con la biodistribución, degradación y seguridad de la sílice en diferentes órganos y tejidos para el empleo de la sílice en biomedicina.

Dentro del contexto de la encapsulación celular en matrices sol-gel, la denominada terapia celular sol-gel trata fundamentalmente el transplante de microrreactores biológicos que actúan como órganos artificiales [157]. En estos sistemas, las células vivas están encapsuladas en una matriz de porosidad controlada que permite la difusión de moléculas pequeñas tales como oxígeno, nutrientes y metabolitos a la vez que se evita el contacto entre las células y especies de mayor tamaño como pueden ser vectores de la respuesta inmunológica que las destruyan al considerarlas como invasores [151]. De esta manera, las matrices en estado húmedo proporcionan un soporte mecánicamente estable y la biocompatibilidad adecuada, a la vez que minimizan el riesgo de rechazo inmunológico del órgano implantado por parte del organismo. Hasta el momento se han descrito estudios en dos tipos de órganos: el páncreas, en el contexto de la *diabetes mellitus*, como dispositivo intracorporal [158,159] y el hígado, como dispositivo extracorporal en el caso de la cirrosis [160,161]. Las matrices de sílice sol-gel cumplen los requisitos mencionados y, en este sentido, resulta imprescindible prestar una especial atención a la minimización de la posible toxicidad derivada del propio proceso de síntesis sol-gel de manera que este aspecto no suponga una limitación en la aplicación biomédica de tales matrices.

En cuanto a los sistemas de liberación controlada de fármacos, constituyen en la actualidad uno de los conceptos biomédicos más prometedores. El desarrollo constante de nuevos fármacos y de terapias biológicas que implican el uso de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales, los convierte en un campo de investigación en continua expansión. Estos sistemas pueden ser descritos como formulaciones

dirigidas hacia áreas específicas del cuerpo que permiten una liberación sostenida en la que el fármaco se dosifica de manera controlada durante un cierto periodo de tiempo. De esta manera, en comparación con las terapias tradicionales de administración, permiten mantener la concentración de fármaco apropiada en el tejido donde es necesario, sin sobrepasar el umbral tóxico. Así se aumenta la eficacia terapéutica y se reduce la toxicidad del fármaco administrado. En este contexto se han empleado nanopartículas poliméricas, liposomas o micelas [150]. Sin embargo, estas matrices orgánicas presentan ciertas desventajas como son su limitada estabilidad química y mecánica, susceptibilidad de contaminación microbiana o control inadecuado de la velocidad de liberación. Así, la posibilidad de emplear materiales mesoporosos ordenados de sílice como matrices cerámicas que permitan la adsorción de fármacos para su posterior liberación controlada, unido a su comportamiento bioactivo [19,147], arroja prometedoras esperanzas para la aplicación de estas cerámicas en el campo biomédico, especialmente interesante en el tratamiento y la regeneración de tejido óseo [16].

Fue en 2001 cuando estos materiales fueron propuestos, por vez primera, como sistemas de liberación controlada de fármacos [14]. Su estructura porosa ordenada y tamaño de poro homogéneo favorece la reproducibilidad de los procesos de adsorción y liberación de biomoléculas. Su elevada superficie específica les confiere gran capacidad de adsorción y su elevado volumen de poro permite albergar la cantidad de fármaco requerida. Además, en su superficie existen grupos silanol susceptibles de reaccionar químicamente con moléculas orgánicas en un proceso denominado funcionalización que permite controlar la interacción biomolécula-matriz y así modular los procesos de adsorción y liberación. Posteriormente, en 2006 se demostró que estos sistemas pueden actuar como biocerámicas implantables con capacidad para la regeneración ósea [15]. Así pues, la combinación adecuada de estas dos características ha llevado al desarrollo de biocerámicas capaces de liberar de manera local fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el tejido óseo, tales como bisfosfonatos, fármacos muy potentes que presentan baja absorción intestinal y de los que tan sólo pequeñas dosis son necesarias [15,162,163]. Estas características hacen de estos sistemas excelentes candidatos para su empleo en tecnologías de regeneración ósea. Desde entonces, la investigación ha estado centrada en tratar de controlar la dosis liberada para una aplicación concreta en función de las necesidades de cada paciente. Estas estrategias

han estado basadas en la modulación de los parámetros texturales, prestando especial atención a la funcionalización de la superficie de la sílice [17].

Es interesante comentar que uno de los problemas más específicos de los sistemas de liberación de fármacos es la pérdida de actividad de ciertos fármacos antes de alcanzar el tejido diana como resultado de la degradación prematura del principio activo. Para solventar estos problemas existen sistemas *inteligentes* que responden a estímulos externos. Estos sistemas son especialmente útiles para tratamientos específicos de larga duración, en los que, dependiendo de la evolución de la enfermedad, se aumenta o disminuye la velocidad de administración del fármaco. Así los poros de los materiales mesoporosos ordenados de sílice pueden ser empleados como reservorios de fármacos que sean liberados respondiendo a estímulos externos de tipo químico, magnético, térmicos, pH, luz o ultrasonidos [164,165,166,167]. Además, el control de la morfología de partícula y de su tamaño permite aumentar la reproducibilidad de la liberación e incluso permitir la internalización de las nanopartículas de sílice por parte de las células [127], ampliando así sus aplicaciones.

El diseño de materiales cerámicos porosos avanzados para la regeneración de tejido óseo es uno de los grandes retos actuales en la investigación de biomateriales [19,168,169]. Existen dos aproximaciones para lograr la regeneración ósea: regeneración del tejido *in situ* e ingeniería de tejidos. La posibilidad de obtener biocerámicas como piezas macroporosas permitiría aplicarlos tanto en la regeneración *in situ* de tejido óseo como en la fabricación de sólidos celulares para aplicación en ingeniería de tejidos. Dado que el papel fundamental en la regeneración va a ser desempeñado por las células, resulta imprescindible obtener soportes en forma de piezas con una porosidad diseñada similar a la del hueso natural [170,171] y así permitir que el tejido formado pueda cumplir sus diferentes funciones fisiológicas. Por ello, es interesante desarrollar métodos de conformado que proporcionen macroporosidad interconectada en el rango de 20-1000 μm [172] a la vez que preserven la mesoporosidad intrínseca de los materiales de partida. De esta manera, la mesoporosidad permite albergar biomoléculas de interés clínico y la macroporosidad permite el crecimiento de tejido óseo, su oxigenación y finalmente su vascularización. Por otra parte, mediante la funcionalización de la superficie externa del material con péptidos o factores de crecimiento que actúen como señales osteoinductores [173,174],

es posible atraer a las células formadoras de hueso e inducirlas a cumplir su función. Así, la investigación actual se dirige hacia la obtención de biomateriales que ayuden al cuerpo humano en su función de regeneración en el sentido de recuperar la función del tejido dañado [175] además de su estructura.

I.1.4.2.- Bioencapsulación

Hoy en día, la inmovilización de material biológico tal como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, bacterias, virus o incluso células en las matrices adecuadas, encuentra aplicación en el desarrollo de biorreactores, sensores, catalizadores o incluso en el desarrollo de órganos artificiales con aplicaciones en biotecnología y biomedicina.

En particular, la inmovilización de células animales mediante encapsulación supone un gran reto ya que éstas son mucho más sensibles que las biomoléculas. Históricamente, las matrices más ampliamente utilizadas han sido biopolímeros de membrana o hidrogeles orgánicos (alginato, alginato-poly-L-lysina, quitosano, polietilenglicol, colágeno) [176]. La encapsulación de células animales arroja grandes expectativas en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes, el Parkinson o el Alzheimer [177]. Además, la encapsulación celular para el desarrollo de órganos artificiales constituye una estrategia prometedora en biomedicina [154] ya que permite usar estas matrices como soportes rígidos para el crecimiento celular [178] o bien como biorreactores transplantables que se mantienen en contacto con fluidos fisiológicos. La estrategia principal consiste en embeber las células en una matriz de porosidad controlada que proporcione estabilidad mecánica y que permita el libre intercambio de nutrientes, oxígeno, metabolitos y productos de deshecho para asegurar la viabilidad celular, a la vez que se evita el rechazo de las células transplantadas por parte del sistema inmune [179,180,181]. Esta aproximación se muestra de manera esquemática en la Figura I.8.

Entre los soportes disponibles para inmovilización de estas especies, los geles de óxidos inorgánicos obtenidos por tecnología sol-gel son buenos candidatos [156]. En particular, la sílice amorfa obtenida por el método sol-gel es adecuada como matriz para la inmovilización de células ya que presenta características apropiadas, entre ellas las bajas temperaturas de obtención, su porosidad y su elevada superficie específica así como la posibilidad de funcionalización de la superficie. Además, la sílice es químicamente

inerte, ópticamente transparente, resistente al ataque microbiano y posee buena estabilidad térmica y mecánica, características favorables para dicha aplicación.

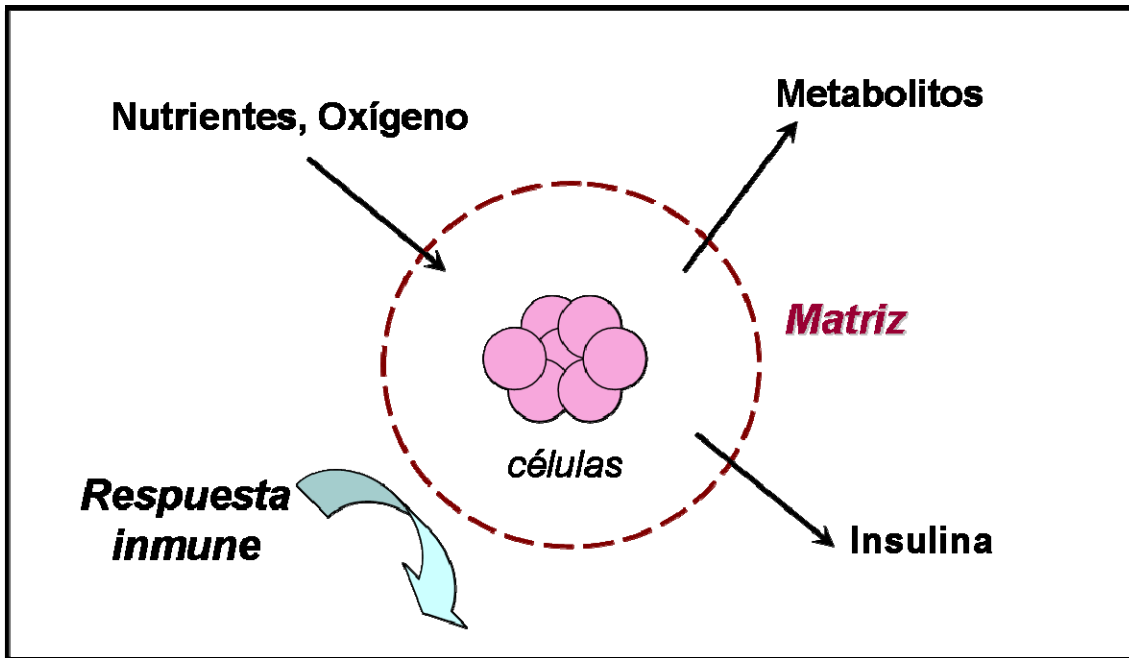


Figura I.8. Esquema de la inmovilización de células en una matriz. Adaptado de la referencia [177].

Desde el punto de vista histórico y en sentido amplio, los primeros estudios sobre inmovilización de biomoléculas en matrices síliceas fueron llevados a cabo con enzimas en los años cincuenta [156]. Sin embargo, el verdadero desarrollo de estos materiales para encapsulación coincidió con el desarrollo de los materiales híbridos orgánico-inorgánico obtenidos por sol-gel en los años ochenta. Así, los estudios comenzaron con enzimas y se extendieron a otras biomoléculas para el desarrollo de biosensores y biorreactores [182,183]. No obstante, no fue hasta los años noventa cuando se encapsularon los primeros micro-organismos y bacterias [184,185,186] y se desarrolló el potencial de las matrices síliceas sol-gel para la encapsulación como consecuencia del desarrollo de biofármacos y proteínas terapéuticas [156]. El primer estudio que demostró la aplicabilidad del proceso sol-gel en el campo del trasplante celular fue la encapsulación de isletas pancreáticas de Langerhans [187].

Aunque la sílice amorfa se utiliza en aplicaciones médicas y se considera biocompatible *in vitro*, es preciso tener en cuenta los posibles efectos adversos que los geles de sílice pueden ejercer sobre las células encapsuladas [126]. De manera más específica, durante

la encapsulación sol-gel *in situ*, las células interactúan con los precursores de sílice al mismo tiempo que se producen las reacciones de hidrólisis y condensación para formar la estructura del gel de sílice. Así, las condiciones asociadas al método sol-gel pueden afectar a la viabilidad de especies tan delicadas como son las células vivas [188].

Los procedimientos estándar de síntesis sol-gel que emplean tetra-alcoxisilanos como precursores silíceos implican valores de pH extremos, liberación de alcohol como subproducto de reacción y etapas de secado que provocan la contracción del sólido el cual ejerce presión en las especies encapsuladas. Por ello, es necesario desarrollar métodos que modifiquen este proceso hasta hacerlo óptimo para la encapsulación de células. Algunos de estos métodos se basan en la eliminación del alcohol generado por evaporación, la combinación de la sílice con polímeros u otros aditivos que ayuden a preservar la viabilidad celular [189] o el empleo de relaciones $R = \text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$ elevadas en la síntesis. El protocolo sintético consiste generalmente en una síntesis en dos etapas [187,190,191]: una primera de hidrólisis del sol a pH ácido y una posterior gelificación a pH neutro. Es en la transición del sol a gel cuando la suspensión de células vivas se incorpora ocasionando la gelificación casi inmediata, quedando las células atrapadas en la red inorgánica la cual se mantiene en estado húmedo [192]. La Figura I.9 muestra de manera esquemática el proceso sol-gel en dos etapas para la encapsulación celular.

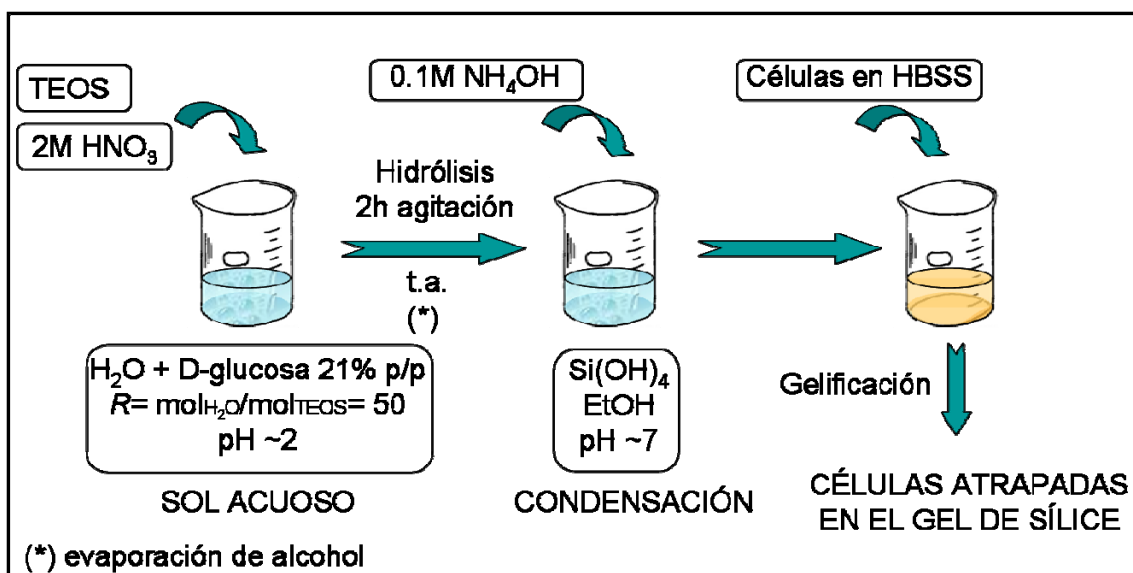


Figura I.9. Esquema del proceso sol-gel en dos etapas para la encapsulación celular.

Aún así, si bien es cierto que la ruta descrita ofrece buenos resultados, es preciso mencionar que el empleo de precursores alternativos a los tetra-alcoxisilanos, como son

los silicatos o la sílice coloidal presenta ciertas ventajas ya que, entre otros aspectos, no se genera alcohol como subproducto de reacción [193]. Otras alternativas consisten en la encapsulación de las células en una matriz polimérica de alginato que posteriormente se recubre con sílice o las llamadas *biocers* implican la mezcla con aditivos orgánicos y secado por liofilización [194,195]. En general, muchos de los procesos que permiten preservar células en sílices obtenidas por sol-gel están inspirados en el proceso *Biosil* [196], en el que se lleva a cabo la pre-encapsulación de los organismos vivos en un biopolímero que es posteriormente silicificado a través de la deposición de alcóxidos de silicio volátiles en fase gaseosa. De esta manera, la corriente de gas elimina el alcohol generado, se minimiza la presión ejercida por la matriz en el encapsulado y además no existe contacto directo entre los precursores de sílice y las células durante la fase de condensación. De este modo, la viabilidad de las células encapsuladas mejora notablemente.

En el contexto de la bioencapsulación en matrices inorgánicas, la investigación actual está dirigida hacia la búsqueda de nuevos procedimientos que permitan mantener la viabilidad celular durante tiempos largos. Hasta la fecha, las publicaciones sobre la encapsulación de células en matrices síliceas describen las condiciones de inmovilización para un tipo concreto de células tales como levaduras, células vegetales, isletas pancreáticas o, en la mayoría de los casos, bacterias observándose grandes diferencias entre la viabilidad de las bacterias y cualquier otro tipo de células, independientemente de la mayor tolerancia al alcohol de las primeras. Ya que el método sol-gel no es aún un método genérico para la encapsulación de organismos vivos, las condiciones han de ser cuidadosamente adaptadas a cada tipo de célula. De hecho, el estudio de la viabilidad celular en matrices síliceas constituye un factor fundamental para que la adaptación del proceso sol-gel pueda competir con los procesos tradicionales de encapsulación en matrices poliméricas. El estudio de la viabilidad celular a corto plazo en estas matrices permite demostrar la no toxicidad de la sílice. Sin embargo, para el empleo de estos materiales como biorreactores implantables que hagan uso de la actividad de las células es necesario estudiar y mejorar su viabilidad a largo plazo.

I.1.4.3.- Liberación controlada de moléculas biológicamente activas

En los sistemas tradicionales de liberación de fármacos los niveles de principio activo administrado aumentan rápidamente su concentración plasmática para luego decaer exponencialmente a medida que el fármaco es excretado y/o metabolizado. El inconveniente de estos sistemas es que no permiten el control ni de la velocidad de liberación ni del lugar específico de administración, proporcionando una liberación de fármaco rápida e inmediata. El nivel terapéutico de fármaco en sangre se sitúa entre la concentración por encima de la cual el fármaco es tóxico y la concentración por debajo de la cual el tratamiento no es efectivo. En estos sistemas, la manera de mantener el nivel terapéutico adecuado durante un periodo prolongado de tiempo consiste en la administración frecuente y en el aumento de la dosis, lo cual hace que la concentración de fármaco fluctúe enormemente pudiendo llegar a tener efectos tóxicos. Los *sistemas de liberación controlada de fármacos* se han desarrollado para solventar estos problemas [150] ya que aumentan la estabilidad del principio activo, mejoran el control de sus niveles plasmáticos incrementando la eficacia terapéutica y reducen los efectos secundarios y trastornos del paciente. Un sistema de tales características debe ser capaz de dosificar el fármaco de manera sostenida (control temporal), localizada (control espacial) y, cuando sea posible, la administración del agente activo debe estar vectorizada hacia un tejido o entorno de células específico.

Existen diferentes tipos de liberación controlada en función de su método de preparación y del mecanismo que regule dicha liberación [197]. Esquemáticamente puede proponerse la siguiente clasificación:

- a) Sistemas físicos
 - Controlados por difusión. El control de la liberación se basa en un proceso de difusión desde reservorios (a través de una membrana) o desde sistemas monolíticos (a través del *bulk*) que a su vez pueden ser porosos, biodegradables/bioerosionables, hidrogeles (liberación por *swelling* de la matriz polimérica), y en los que el fármaco puede estar disuelto o dispersado [198].
 - Basados en resinas de intercambio iónico.

- Controlados por activación del disolvente: bien controlados por ósmosis mediante el transporte de la sustancia a través de una membrana semipermeable [199] o equilibrados hidrodinámicamente mediante el control del paso de agua al interior de la matriz [200].
- b) Sistemas químicos. Incluyen la inmovilización del fármaco el cual se libera por un proceso de degradación (de la superficie o del *bulk*, unido a difusión) o por hidrólisis [201], mediante control químico.
- c) Sistemas biológicos. Incluyen la terapia génica, un nuevo tratamiento para enfermedades con alteraciones genéticas que actúa a nivel celular con genes “curativos” como agentes terapéuticos [202].
- d) Sistemas inteligentes (*stimuli-responsive*). La liberación se regula mediante estímulos externos tales como campos magnéticos, ultrasonidos, pH, luz, etc. [203].
- e) Sistemas transdérmicos. La iontoforesis, a través de la aplicación de un potencial eléctrico, en conjunción con otras técnicas como la sonoforesis o la electroporación, permite ampliar el número de moléculas terapéuticas capaces de penetrar la piel hasta alcanzar el torrente sanguíneo [204].

El desarrollo de nuevas moléculas activas y nuevos tratamientos como la terapia génica lleva al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y la búsqueda de nuevas aproximaciones para administrarlos. Por otro lado, el avance de la nanotecnología ha motivado el desarrollo de materiales nanoestructurados para aplicaciones biomédicas [16,205]. Una de estas aplicaciones implica la investigación en materiales porosos como sistemas de liberación controlada de fármacos y moléculas biológicamente activas.

Los materiales mesoporosos ordenados de sílice presentan una red de poros ordenada, elevada superficie específica y volumen de poro, distribuciones de diámetro de poro estrechas y la posibilidad de decorar su superficie con diversas funcionalidades químicas. Todas estas características permiten alcanzar elevadas cargas de moléculas activas y la posibilidad de ejercer un control adecuado en la velocidad de liberación. Además, su composición química similar a la de los vidrios bioactivos [206], los convierte en buenos candidatos para su empleo en tecnología de regeneración ósea [19]. De esta manera, los materiales mesoporosos ordenados de sílice pueden ser empleados

como materiales de partida para fabricar andamios que permitan liberar fármacos de manera local en el tratamiento de patologías óseas. En la Figura I.10 se muestra la aplicación de los materiales mesoporosos ordenados de sílice como sistemas para la liberación controlada de fármacos y sistemas para la regeneración ósea. Así, estas matrices han sido propuestas como reservorios de fármacos implantables, orales, transdérmicos o inyectables así como sistemas para la regeneración de tejido óseo [15,21]. Desde que estas matrices fueran propuestas por vez primera como sistemas de liberación de fármacos [14] numerosas biomoléculas han sido confinadas en sus poros, entre ellas proteínas y aminoácidos [20,26,207,208]. Además, en el futuro estas matrices constituirán sistemas sofisticados de liberación controlada basada en estímulos externos [164,166,209,210,211,212] y sistemas multifuncionales con aplicación en múltiples terapias y en diagnóstico [213,214,215].

Muchos de los sistemas de liberación de fármacos comerciales están basados en sistemas poliméricos [151]. No obstante, uno de los problemas actuales de estos vectores es la pérdida de actividad que experimentan ciertos fármacos antes de alcanzar tejido diana como resultado de la degradación prematura del principio activo. En este sentido, varios estudios han demostrado que el confinamiento en matrices mesoporosas permite preservar la actividad de diversas moléculas [216,217].

Así, las ventajas de los biomateriales implantables como sistemas de liberación de fármacos son muchas llegando a ser unos de los conceptos terapéuticos más prometedores en cirugía ortopédica [218]. Ya que proporcionan una concentración local elevada del fármaco directamente en el tejido donde se necesita, son especialmente útiles tras la cirugía para la fijación de un implante, cuando existe el peligro de inflamación, infección y el riesgo de rechazo. Si a esto unimos su capacidad de biodegradación, hacen que no sea necesario la extracción del implante tras el tratamiento. Puesto que en muchas ocasiones se hace necesario ingerir elevadas dosis de manera oral para alcanzar la concentración adecuada en el tejido óseo, débilmente irrigado, una liberación controlada desde el implante puede ayudar a reducir los problemas de adaptación del paciente y minimizar los efectos colaterales tóxicos derivados de tratamientos prolongados con fármacos administrados oralmente.

El verdadero avance en este tipo de aplicaciones se centra tanto en la liberación localizada en la que el fármaco sólo actúa en el tejido diana donde se necesita, como en

el control de la dosificación, de manera que el fármaco se libera de forma controlada durante un determinado periodo de tiempo. Por todo ello, el interés se centra en el diseño de métodos por los que estas matrices se puedan adaptar para obtener una respuesta adecuada y una liberación específica de acuerdo a las necesidades clínicas de cada paciente.

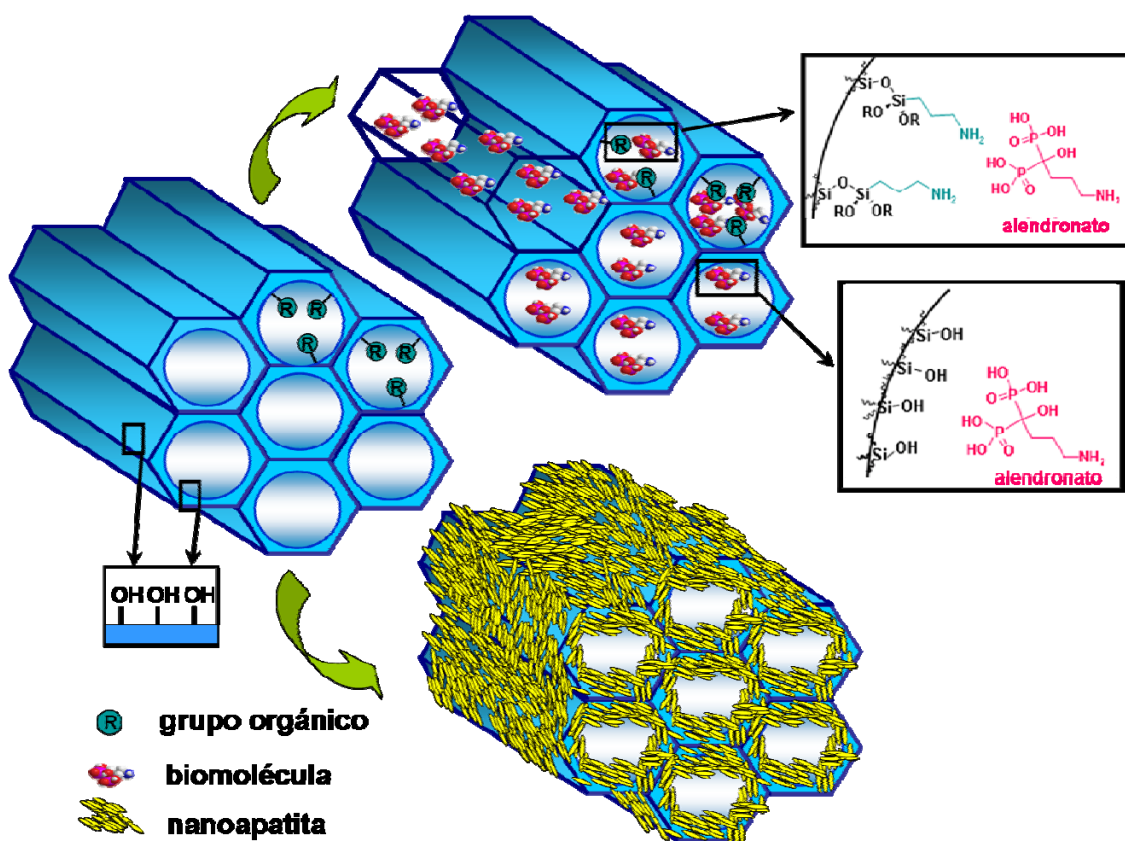


Figura I.10. Aplicaciones potenciales de los materiales mesoporosos ordenados de sílice derivadas de su composición y sus propiedades texturales: sistemas de liberación controlada de biomoléculas (arriba) y sistemas para la regeneración ósea (abajo).

Los ensayos de adsorción y liberación *in vitro* son imprescindibles para evaluar el comportamiento de los materiales mesoporosos ordenados de sílice como sistemas para la liberación controlada de fármacos. La adsorción de las biomoléculas en la superficie de estos materiales se suele llevar a cabo mediante impregnación del sólido en disoluciones concentradas de biomolécula. Las condiciones de carga tales como temperatura, pH, disolvente, etc. han de ser seleccionadas de acuerdo con la naturaleza química de las biomoléculas implicadas [219]. Tras la carga, se procede a la caracterización físico-química del material. La difracción de rayos X permite corroborar que la estructura mesoporosa del material se conserva tras la carga y coincide con la del

material de partida. Para comprobar que las biomoléculas se han adsorbido, además de en la superficie externa, dentro de los poros del material, se realizan medidas de adsorción/desorción de nitrógeno. La disminución general de los parámetros texturales como son el tamaño o el volumen de poro tras la adsorción, indica la inclusión de las biomoléculas dentro de los poros. Recientemente, se ha empleado microscopía electrónica de transmisión para comprobar que biomoléculas están adsorbidas en el interior de los poros [220]. Además, técnicas como la espectroscopía de infrarrojos permiten confirmar la naturaleza de la biomolécula y la cantidad adsorbida puede cuantificarse mediante análisis termogravimétrico. Por otro lado, los ensayos de liberación *in vitro* consisten en la inmersión de los materiales cargados en fluido fisiológico simulado (*SBF, simulated body fluid*) [221], que contiene los mismos iones, y en la misma concentración que el plasma humano en condiciones normales, prescindiendo de proteínas y otras macromoléculas, o bien en una solución salina a pH 7.4 y 37 °C para imitar las condiciones fisiológicas. La detección y cuantificación de la molécula liberada al medio suele llevarse a cabo mediante espectroscopía ultravioleta-visible.

La adsorción y liberación de biomoléculas se basa en débiles interacciones biomolécula-matriz por lo que los parámetros relacionados con la superficie del material, además del tamaño de poro, geometría, conectividad entre los poros y posibles reacciones de la matriz con el medio circundante (disolución de la sílice) son algunos de los muchos factores a tener en cuenta en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos [17], tal y como se muestra en la Figura I.11.

El tamaño de poro determina el tamaño de la biomolécula que puede adsorberse en los mesoporos [222]. Además, también puede ejercer un efecto de tamiz molecular para moléculas grandes [223] y controlar la velocidad de liberación [224,225,226] ya que diámetros mayores favorecen el transporte molecular. La conectividad de la red de poros, la geometría y la degradación de la matriz [227] así como la morfología y tamaño de las partículas [226,228] son factores adicionales que influyen en la adsorción y la liberación. Las estructuras con poros grandes conectados por ventanas pequeñas favorecen la liberación y morfologías regulares de partícula proporcionan procesos de carga y liberación más reproducibles. Recientemente se han sintetizado materiales mesoporosos ordenados que presentan quiralidad [66], propiedad muy interesante ya

que permite la selección del enantiómero activo que va a ser incorporado. La morfología externa de los materiales (discos o polvo) también influye en la cinética de liberación [229] ya que cuanto mayor sea la superficie expuesta más rápida es la liberación. Asimismo se ha observado que la incorporación de biomoléculas no está favorecida si la relación entre el tamaño de la molécula y el tamaño de poro es demasiado grande o demasiado pequeña [219].

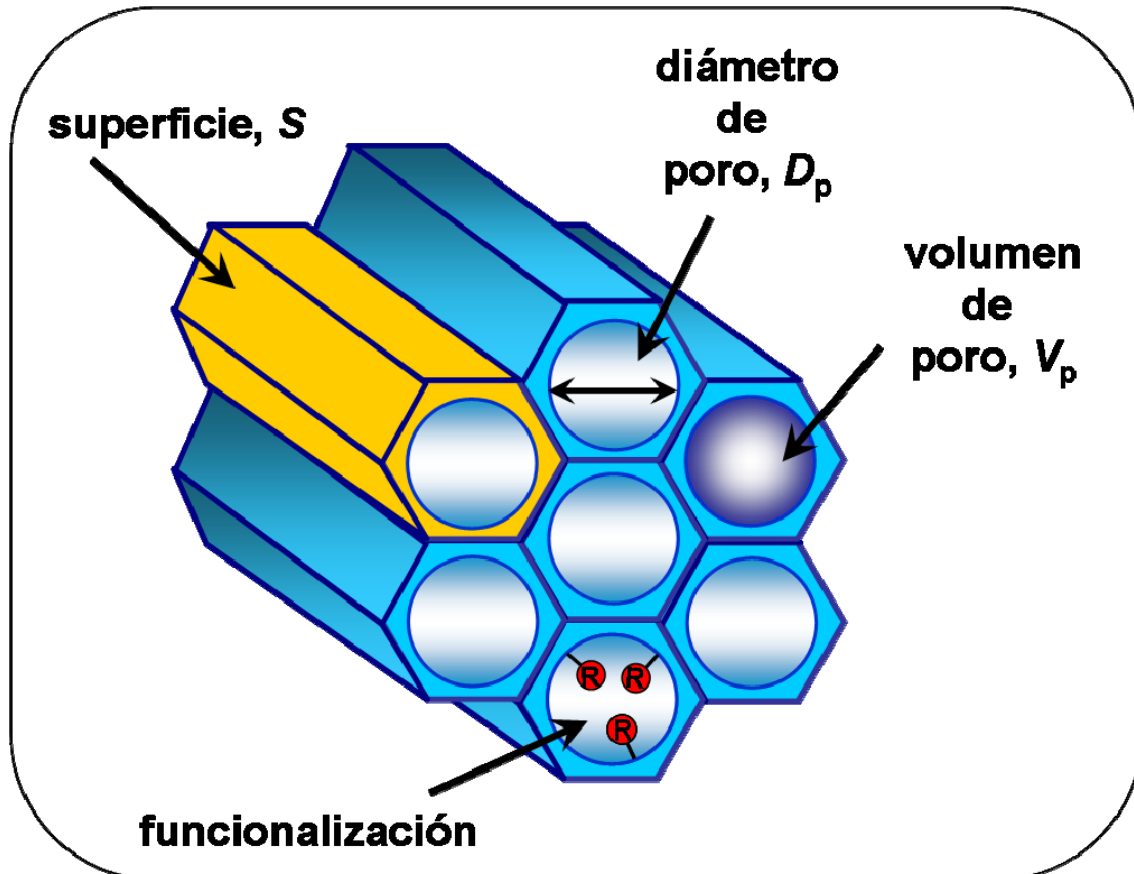


Figura I.11. Algunos parámetros que influyen en la adsorción y liberación de moléculas biológicamente activas desde matrices mesoporosas ordenadas.

Ya que las propiedades de la superficie juegan un papel fundamental en los procesos de adsorción y liberación, para controlar la cantidad de fármaco adsorbida existen varias aproximaciones que consisten bien en aumentar o reducir la superficie específica, bien en modificar la afinidad biomolécula-matriz. En general, a mayor superficie específica, mayor cantidad de fármaco adsorbida [219]. En cuanto al volumen de poro, un valor elevado favorece la interacción entre las biomoléculas en el interior de los poros lo cual a su vez favorece el llenado de los mismos [230]. En cuanto a la modificación de las interacciones biomolécula-matriz a través de la modificación orgánica de la superficie

de la matriz mesoporosa [2,13,207,231] y, tal y como ha sido comentado anteriormente, la elevada densidad de grupos silanol en la superficie permite funcionalizar las superficies por reacción con organosilanos. Los grupos orgánicos son capaces de interaccionar con las biomoléculas por lo general a través de interacciones no covalentes (interacción electrostática, fuerzas de van de Waals, enlaces de hidrógeno e interacción hidrofóbica), aunque se ha descrito también la interacción a través de grupos éster [232]. El método más frecuente para controlar la adsorción y liberación es favorecer tales interacciones [15,233,234,235]. Sin embargo, también es posible funcionalizar con grupos hidrófobos que no necesariamente favorecen tales interacciones sino que impiden el transporte molecular hacia el exterior ya que el medio acuoso no puede penetrar fácilmente en los poros [208,236,237], regulando así la liberación. Otra estrategia consiste en el control de la composición del material mesoporoso basada en la síntesis de óxidos binarios de Si-Zr que permite modular la acidez de la estructura y eventualmente la adsorción y liberación de biomoléculas mediante modificación del contenido en Zr y del pH de adsorción [238]. La Figura I.12 muestra algunas funcionalizaciones de los poros de materiales mesoporosos y las estructuras de algunas biomoléculas adsorbidas en tales sistemas.

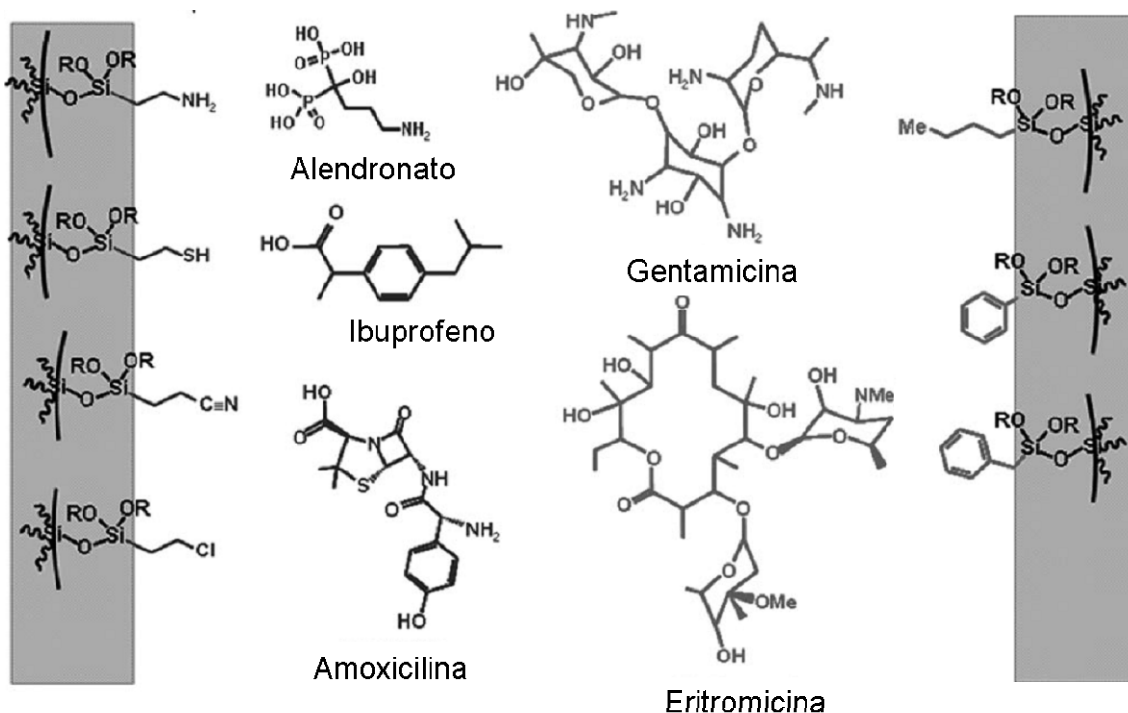


Figura I.12. Funcionalización de la superficie de materiales mesoporosos de sílice y estructuras de algunos fármacos ensayados. Adaptada de la referencia [16].

Tal y como se ha comentado, la eficacia de estos sistemas para controlar la dosis suministrada depende no sólo de la cantidad de fármaco capaz de albergar en sus poros sino también de la cinética de liberación. Los perfiles de liberación más comunes en materiales mesoporosos se muestran en la Figura I.13 (a). La Figura I.3 (b) muestra perfiles experimentales de liberación de ibuprofeno desde matrices MCM-41 en las que el tamaño de poro regula dicha liberación [17].

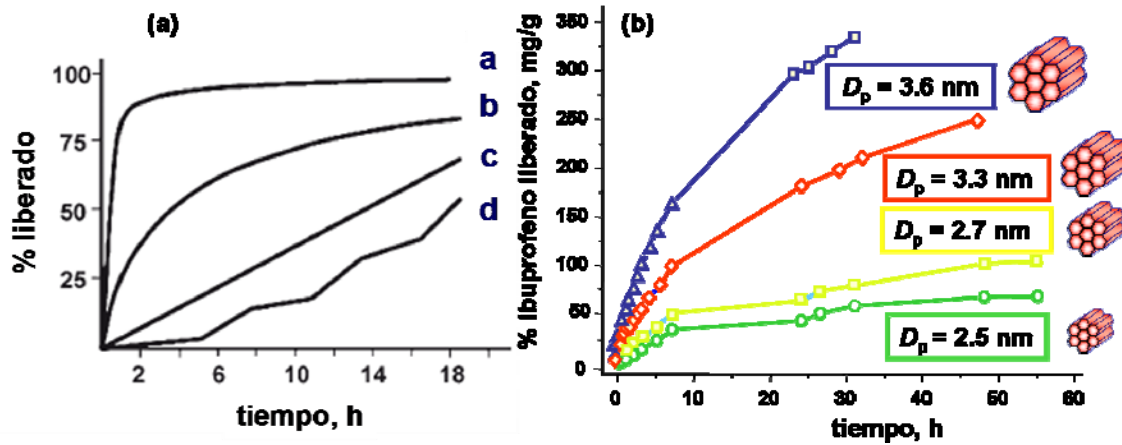


Figura I.13. (a) Perfiles teóricos de liberación desde materiales mesoporosos [16] (b) perfiles experimentales de liberación de ibuprofeno desde matrices MCM-41 con distinto tamaño de poro [17].

El perfil *a* se observa en matrices sin funcionalizar y se caracteriza por la existencia de una liberación descontrolada inicial de fármaco (*burst effect*) seguida de una liberación lenta [14] que sigue una cinética de orden cero, descrita por la ecuación

$$\frac{Q_t}{Q_0} = k_0 t \quad (\text{ec. I.4})$$

donde Q_t y Q_0 representan la cantidad de biomolécula adsorbida en la matriz porosa a tiempo t y a tiempo inicial, respectivamente y k_0 es la constante cinética de orden cero independiente de la concentración y del área accesible al disolvente. Este perfil es de utilidad en condiciones de infección aguda o inflamación en las que se necesita una dosis elevada de manera inmediata. Por otro lado, el perfil *b* está asociado a procesos de difusión o disolución y sigue una cinética de primer orden, descrita por la ecuación

$$\frac{Q_t}{Q_0} = 1 - e^{-k_1 t} \quad (\text{ec. I.5})$$

donde la constante cinética de primer orden, k_1 , contiene información acerca de la accesibilidad del disolvente y el coeficiente de difusión a través de los canales de sílice mesoporosa. El perfil *c* corresponde a una cinética de orden cero donde la liberación sólo depende del tiempo, muy útil para conseguir una liberación sostenida a largo plazo. Finalmente el perfil *d* muestra un sistema que varía su liberación en función de estímulos externos.

I.1.4.4.- Infección en biocerámicas

Ha quedado demostrado que los materiales mesoporosos de sílice son candidatos excelentes para actuar como biomateriales implantables para el relleno de defectos óseos, capaces de actuar como sistemas de liberación local de biomoléculas y de promover la regeneración del hueso. Sin embargo, existe poca información acerca de la susceptibilidad de estas biocerámicas a la infección.

En sentido amplio, a pesar de las ventajas que ofrecen los biomateriales en cirugía ortopédica, presentan el riesgo de facilitar la aparición de infecciones. Esto se debe, en buena medida, a que al material inorgánico en tejido vivo le falta protección frente a la adherencia de bacterias. Las infecciones relacionadas con biomateriales son de las infecciones nosocomiales¹ más importantes debido a sus efectos potencialmente devastadores [239] que llevan frecuentemente a la retirada del implante [240,241].

Algunos de los factores que influyen en el mecanismo de infección son, por un lado, las características de la bacteria y el material (comportamiento hidrófobo-hidrófilo [242] y carga superficial [243,244]). Por otro lado, la superficie del material en lo que respecta a su composición química [245], la rugosidad de la superficie [246,247] o la distribución de tamaños de poro [248,249]. Además, influyen factores del medio como son temperatura, tiempo de exposición, concentración bacteriana, tratamiento químico o presencia de antibióticos. En general, una superficie porosa favorece la adhesión bacteriana, preferentemente en las irregularidades [250]. Así, los materiales

¹ Una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado.

mesoporosos ordenados de sílice, con una elevada superficie específica son susceptibles de colonización por microorganismos. El tipo de bacterias más ampliamente relacionado con infecciones en implantes son: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* [251].

El mecanismo de infección sobre biomateriales es un proceso muy complejo en el que el primer paso y el más crítico es la adherencia sobre la superficie. La adhesión celular y la colonización bacteriana compiten por la superficie [252] de manera que, si la primera ocurre más rápido, las bacterias se encontrarán con un tejido vivo con respuesta inmunitaria activa y resistente a bacterias en vez de con una superficie lista para colonizar. La infección originada en un biomaterial colonizado por bacterias es difícil de tratar si éstas llegan a formar *biofilm*. Cuando esto ocurre, las bacterias quedan perfectamente ancladas sobre el sustrato, protegidas del sistema inmune presentando además una elevada resistencia a los antibióticos [253]. Por todo ello, es prácticamente imposible erradicar el *biofilm* y la manera más efectiva de solucionar el problema es mediante retirada del implante lo que aumenta el tiempo y el precio del tratamiento, causando malestar al paciente. Por ello, hoy en día el desarrollo de materiales y métodos para minimizar la adherencia bacteriana constituye un área de investigación muy activa en el campo de los biomateriales.

I.2.- SÍNTESIS DE SÍLICE POROSA POR TECNOLOGÍA SOL-GEL PARA LA ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS

Cell viability in a wet silica gel. Alejandra Nieto, Sami Areva, Timothy Wilson, Reeta Viitala, María Vallet-Regí. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5, 3478-3487

Resumen

El proceso sol-gel se basa en la hidrólisis y polimerización de alcóxidos de silicio en medio acuoso a temperaturas moderadas. Es una técnica muy versátil y ofrece numerosas posibilidades en biotecnología ya que además los productos de sílice son, por lo general, biocompatibles y no tóxicos. Asimismo se ha demostrado que las matrices síliceas sol-gel presentan características que las hacen aptas para la encapsulación de biomoléculas, proteínas, virus, etc. con vistas a su aplicación en el desarrollo de biorreactores implantables en el organismo y órganos artificiales. El propósito de este estudio ha sido el desarrollo y puesta a punto de un procedimiento sol-gel en dos etapas para la obtención de materiales porosos de sílice que permitan la encapsulación de células vivas en su interior durante la síntesis así como el posterior estudio de su viabilidad a corto plazo.

La estrategia sol-gel se ha adaptado para permitir la encapsulación de dos tipos de células modelo, fibroblastos y células epiteliales. El proceso sol-gel se ha llevado a cabo en dos etapas, primero una hidrólisis ácida partiendo de tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor de sílice, seguido de una etapa de condensación-gelificación en medio neutro. Para minimizar la disolución de la matriz sílicea, mejorar la integridad celular y aumentar la biocompatibilidad del proceso, la estrategia seguida ha consistido en la elección de una relación molar $H_2O/TEOS$ (R) elevada, la adición de glucosa como porógeno y fuente de nutrientes, además de la eliminación del alcohol generado en la hidrólisis del alcóxido de silicio. La incorporación de las células al sol neutro, provoca su gelificación inmediata quedando atrapadas en la matriz sílicea. Para facilitar la manipulación de los materiales de sílice obtenidos en estado húmedo, se han utilizado moldes cilíndricos para conformarlos como piezas monolíticas. A continuación se ha evaluado la citotoxicidad de la sílice obtenida y la viabilidad de las células encapsuladas a tiempo inicial mediante métodos estándar, demostrando así la no toxicidad de la sílice.

Finalmente, con objeto de mejorar la viabilidad celular, se han estudiado métodos para favorecer la agrupación de células, obteniendo resultados satisfactorios.

De esta manera, los materiales obtenidos pueden ser considerados como buenos candidatos en aplicaciones en biomedicina para el diseño de andamios para el cultivo de tejidos, el diseño de órganos artificiales o como biorreactores implantables.

I.3.- ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS

Actualmente, la investigación en el desarrollo de materiales mesoporosos ordenados de sílice para aplicaciones en biomedicina se centra en la combinación de la capacidad de estas matrices para actuar como sistemas para la liberación controlada de fármacos junto con la respuesta bioactiva de la sílice mesoporosa, capaz de inducir la formación de una capa de apatita en su superficie. Estas dos características han inspirado la síntesis de nuevas biocerámicas capaces de (i) liberar diversas biomoléculas tales como bisfosfonatos para el tratamiento local de enfermedades óseas y (ii) que ayuden a reparar y regenerar el hueso en el tratamiento de defectos óseos. De esta forma, se lograrían dos efectos positivos para el organismo con la implantación de este tipo de biocerámicas cargadas con moléculas biológicamente activas.

La capacidad que tienen los bisfosfonatos para inhibir la resorción ósea les hace útiles en el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis, en la cual existe un desequilibrio entre los procesos de formación y resorción de hueso, con predominio de este último. Son fármacos muy potentes que, sin embargo, presentan una pobre biodisponibilidad, por ser muy resistentes a la hidrólisis, de manera que a nivel gastrointestinal se absorbe sólo una pequeña parte de la dosis administrada vía oral. Por ello es necesario ingerir dosis elevadas, lo cual puede ocasionar efectos secundarios. Estos inconvenientes, junto con el creciente número de personas que padecen enfermedades óseas en una población que envejece como consecuencia del aumento de la esperanza de vida, hacen necesario buscar nuevas formas de administración para estos fármacos. Así, la posibilidad de utilizar matrices mesoporosas ordenadas de sílice como reservorios capaces de adsorber y liberar de manera controlada dichas biomoléculas permite aumentar la biodisponibilidad del fármaco en el hueso así como mejorar su dosificación, dotando al paciente de una mejor calidad de vida. El empleo de estas matrices cargadas de principio activo como implantes para el tratamiento y regeneración de defectos óseos, representa un valor añadido.

Es por tanto interesante estudiar cómo ajustar la cantidad de fármaco adsorbida y suministrar la dosis requerida en cada momento y localización, de acuerdo con las necesidades de cada paciente. En este contexto, la dosis está relacionada con la cantidad máxima de biomolécula adsorbida en la matriz silíceas así como con su cinética de

liberación. Por otro lado, se sabe que una funcionalización adecuada de la superficie de estos materiales con moléculas orgánicas permite ejercer un control en la adsorción y liberación de biomoléculas. Por ello, es de especial interés estudiar cómo modificar la superficie para conseguir la dosis apropiada a través del control de las interacciones biomolécula-matriz. En este aspecto se han centrado los dos trabajos de investigación que se describen a continuación.

I.3.1.- ALENDRONATO SÓDICO EN SÍLICES MESOPOROSAS SBA-15 FUNCIONALIZADAS

Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate alendronate dosage. Alejandra Nieto, Francisco Balas, Montserrat Colilla, Miguel Manzano, María Vallet-Regí. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, 116 (1-3), 4-13

Resumen

El objetivo de este trabajo se ha centrado en el diseño de sistemas de liberación de fármacos basados en materiales mesoporosos ordenados de sílice a través del estudio del efecto del grado de funcionalización de la superficie de la sílice en la adsorción y liberación controlada de bisfosfonatos. Estudios previos han demostrado que la funcionalización de la superficie de matrices mesoporosas ordenadas de sílice con grupos aminopropilo permite gobernar la adsorción y liberación de bisfosfonatos. Sin embargo, el ajuste de la dosis a través del control del grado de funcionalización de la matriz es un aspecto nuevo no descrito anteriormente.

En este estudio se ha funcionalizado el material SBA-15 por método post-síntesis con grupos aminopropilo en distintos grados con objeto de favorecer la adsorción del bisfosfonato alendronato sódico y se ha investigado una estrategia de funcionalización mejorada que hace uso de un catalizador en medio débilmente polar, comparándola así con el método en medio anhidro tradicionalmente empleado. Mediante ambos métodos, se ha variado el grado de funcionalización nominal de manera gradual hasta llegar al 100% del valor total de grupos silanol en superficie, estimado en 4.9 OH/nm^2 .

Parece que, independientemente del método de funcionalización empleado, sólo es posible alcanzar un grado máximo de modificación orgánica. Este comportamiento parece estar relacionado con consideraciones estéricas derivadas de la distribución de los grupos aminopropilo en la superficie teniendo en cuenta la posición de los grupos OH en la superficie y el volumen molecular del grupo orgánico anclado. De esta manera, se puede asumir que la cantidad máxima de grupos aminopropilo capaces de ocupar centros Si-OH es menos del 50 % del total de la superficie.

Por otro lado, se observa que la modificación del grado de funcionalización permite controlar los parámetros texturales ya que un aumento del grado de funcionalización ocasiona una disminución gradual de dichos parámetros de manera comparable en ambos métodos. Del mismo modo hace posible modular las propiedades ácido-base de la superficie.

En cuanto a la adsorción de biomoléculas, se observa que el método catalizado induce una carga más gradual de alendronato la cual depende del grado de funcionalización, aumentando la cantidad de alendronato adsorbida a medida que aumenta la cantidad de grupos aminopropilo en superficie. Así se deduce que la adsorción de biomolécula está controlada tanto por su accesibilidad a los grupos aminopropilo como por su velocidad de difusión molecular a través de la matriz mesoporosa.

Finalmente, se observa que la velocidad de liberación de alendronato es independiente del grado de funcionalización. Sin embargo, la cantidad máxima de bisfosfonato liberado está relacionada con el número de grupos aminopropilo anclados en la superficie.

Así, en este trabajo se ha demostrado que la adsorción de alendronato es modulable a través del control del grado de modificación orgánica de la superficie de la sílice y que por tanto existe una relación directa entre la dosis de alendronato y el grado de funcionalización de la matriz.

I.3.2.- DOSIFICACIÓN VERSUS FUNCIONALIZACIÓN

Surface electrochemistry of mesoporous silicas as key factor for the design of tailored delivery devices. Alejandra Nieto, Montserrat Colilla, Francisco Balas, María Vallet-Regí. *Langmuir*, 2010, 26 (7), 5038-5049

Resumen

Las características de adsorción y liberación de biomoléculas desde matrices mesoporosas ordenadas de sílice están directamente relacionadas con la funcionalización de la superficie y las interacciones biomolécula-matriz. La naturaleza de dichas interacciones ha de ser analizada en detalle si pretendemos diseñar sistemas avanzados de liberación de biomoléculas capaces de controlar la dosificación. En la misma línea que el capítulo anterior, y en vistas al diseño de sistemas de liberación controlada de biomoléculas adaptados a necesidades clínicas concretas, se ha llevado a cabo este trabajo cuyo objetivo ha sido determinar los parámetros físicos y químicos que influyen en la adsorción y la liberación de biomoléculas desde estas matrices.

La estrategia seguida se ha basado en la funcionalización de la superficie de la sílice mesoporosa con varios grupos orgánicos para la posterior adsorción de diversas moléculas orgánicas y finalmente el estudio de la electroquímica de su superficie mediante distintas técnicas para así establecer correlaciones entre estos factores y las interacciones biomolécula-matriz, las cuales determinan el comportamiento de adsorción y liberación. Esta aproximación, combinada con las ya existentes, aumenta el abanico de posibilidades para el diseño de nuevos sistemas de liberación controlada adaptados a necesidades clínicas concretas. Para ello, el material mesoporoso ordenado SBA-15 se ha funcionalizado con grupos *aminopropilo*, *etilendiamino*, *fosfatoetilo*, *propil metacrilato* y *ácido carboxílico* en diferentes grados mediante el método post-sintético tradicional. Para los estudios de adsorción se han seleccionado tres moléculas de interés en tecnologías de regeneración ósea tales como el *bisfosfonato ácido zoledrónico*, el *aminoácido L-triptófano* y la *proteína transportadora albúmina sérica bovina*. Tanto la adsorción molecular como los aspectos relacionados con la liberación *in vitro* se han evaluado prestando especial atención a las interacciones *host-guest*.

Los resultados obtenidos están basados en la combinación de medidas electrocinéticas y potenciométricas y el estudio de la energía libre superficial a través de medidas de ángulo de contacto. Se ha observado que la modificación de la carga superficial y la polaridad resultante de la superficie permiten controlar la adsorción y liberación de biomoléculas. De este modo, se ha demostrado la utilidad de estas técnicas como herramientas para estudiar y optimizar la naturaleza de las interacciones biomolécula-matriz a través del diseño de la electroquímica de la superficie. Así se concluye que la electroquímica de la superficie es un factor decisivo en la adsorción y liberación de biomoléculas en estas matrices. Por todo ello, este estudio abre camino para la optimización de la adsorción de biomoléculas en el diseño de sistemas de liberación controlada adaptables a necesidades clínicas concretas.

I.4.- RESISTENCIA A LA INFECCIÓN

Bacterial adherence to SiO₂ based multifunctional bioceramics. Teemu J. Kinnari, Jaime Esteban, Enrique Gómez-Barrena, Nieves Zamora, Ricardo Fernández-Roblas, Alejandra Nieto, Juan Carlos Doadrio, Adolfo López-Noriega, Eduardo Ruiz-Hernández, Daniel Arcos, María Vallet-Regí. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 89A, 215-223

Resumen

En este trabajo se ha investigado la adherencia bacteriana sobre diferentes cerámicas multifuncionales de base silícea para evaluar su comportamiento frente a la infección. Se han elegido las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, ya que provocan la mayoría de las infecciones relacionadas con implantes en este campo. Las biocerámicas estudiadas han sido dos materiales mesoporosos de base silícea (MCM-41, SBA-15), un vidrio mesoporoso ordenado de composición SiO₂-CaO-P₂O₅ (OMG) y una biocerámica bifásica magnética (BMB). La estrategia se ha basado en la incubación de las biocerámicas junto con las bacterias durante 90 minutos, seguido de sonicación para despegar las bacterias y así cuantificar la adhesión bacteriana en cada material. Se observa que la adhesión de *S. aureus* y *S. epidermidis* (10⁸ CFU/ml) es mucho menor en las cerámicas BMB comparado con la adhesión en MCM-41, SBA-15 o BMG. Sin embargo, al normalizar los resultados teniendo en cuenta los poros que por su tamaño son accesibles a las bacterias en cada material, la menor adherencia bacteriana se ha observado para MCM-41 y la mayor para SBA-15.

Para explicar estos resultados se han establecido dos niveles de discusión, uno inherente a las propiedades del material en lo que se refiere a composición química y nanoestructura, y otro derivado del procesado del material, que influye en la superficie total disponible para la adhesión a su vez determinada por la geometría de la pieza, rugosidad y el tamaño y forma de los macroporos mayores de 2 µm. La mayor adhesión al material SBA-15 ha de entenderse en términos de morfología de la superficie y distribución de diámetro de poro ya que muestra una distribución monomodal centrada en 25 µm que favorece la adhesión bacteriana, muy susceptible a este parámetro.

En conclusión, los resultados muestran que la adherencia bacteriana es mayor en las biocerámicas mesoporosas, aunque esta mayor adherencia microbiana se debe principalmente a la porosidad intergranular derivada del conformado de los discos ensayados así como a la morfología de grano más que a la estructura mesoporosa.

I.5.- PROPIEDADES MECÁNICAS

A novel Mullins effect behavior under compression in micelle-templated silica and micelle-templated silica/agarose systems. José Antonio Puértolas, José Luis Vadillo, Sandra Sánchez-Salcedo, Alejandra Nieto, Enrique Gómez-Barrena, María Vallet-Regí. *Chemical Engineering Journal*, 2010, enviado

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de las propiedades mecánicas de materiales mesoporosos ordenados de sílice, en concreto SBA-15, MCM-41 y MCM-48, así como de sistemas en los que se han combinado dichas cerámicas con el polímero agarosa. Los materiales han sido conformados en piezas que se han sometido a ensayos de compresión cíclicos y estáticos.

Se observa que los materiales mesoporosos puros en forma de discos conformados mediante presión uniaxial muestran un comportamiento frágil. Con objeto de mejorar sus propiedades mecánicas, se han conformado piezas de cerámica-agarosa mediante un procedimiento a baja temperatura utilizando moldes de geometría cilíndrica. La agarosa, polímero natural biocompatible y biodegradable, confiere a los sistemas ensayados ductilidad y consistencia elástica permitiendo alcanzar valores de hasta el 60% de deformación, y soportar tensiones de hasta 50 MPa conservando su morfología inicial. Se ha observado que la plasticidad es más acusada en el caso de las piezas sometidas a hidratación. De esta manera, la combinación de la matriz orgánica y la matriz cerámica mejora la resistencia a compresión del hidrogel y evita la inherente fragilidad de la biocerámica.

La presencia de histéresis mecánica en ciclos de compresión consecutivos y el hecho de que las curvas de descarga monótona coincidan con la carga primaria de las curvas en ensayos cíclicos son características típicas del *efecto Mullin*, observado en elastómeros y cauchos reforzados con negro de carbón, y descrito aquí por primera vez para este tipo de sistemas biocerámica-agarosa.

Estas biocerámicas pueden actuar como matrices para albergar moléculas biológicamente activas que promuevan la regeneración ósea, a la vez que como

materiales de relleno ajustables en pequeños defectos óseos que no hayan de soportar elevadas cargas.

I.6.- CONCLUSIONES

El conjunto de los resultados obtenidos en la parte I permite extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha puesto a punto un método sol-gel modificado en dos etapas a partir de alcóxidos de silicio que ha permitido la encapsulación de células vivas durante la síntesis. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que:
 - Una elevada relación molar agua/alcóxido y la adición de glucosa permiten minimizar la disolución de la sílice y mejorar la biocompatibilidad del proceso.
 - La eliminación por evaporación del alcohol generado en la hidrólisis de la fuente de sílice ayuda a preservar la integridad celular.
 - Las células sobreviven al proceso de encapsulación. La evaluación de la viabilidad celular a corto plazo por métodos estándar demuestra la no toxicidad de la sílice así obtenida.
 - Trabajar con células agrupadas en *racimos* favorece la adhesión celular y protege las células encapsuladas, aumentando la viabilidad celular.
2. En la aplicación del material mesoporoso ordenado de sílice SBA-15 como sistema de liberación controlada de fármacos capaz de promover la regeneración ósea, el control del grado de funcionalización de la superficie es un factor clave para modular la dosis de alendronato sódico, existiendo una relación directa entre la dosis de alendronato y el grado de funcionalización de la matriz. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que:
 - La cantidad máxima de grupos aminopropilo capaces de ocupar centros Si-OH es menos del 50 % del total de la superficie. Este comportamiento está relacionado con consideraciones estéricas derivadas de la distribución de los grupos orgánicos en la superficie de la sílice.
 - La modificación gradual del grado de funcionalización produce una variación gradual de los parámetros texturales de la sílice.

- La funcionalización post-síntesis empleando un catalizador en medio débilmente polar induce una adsorción más gradual de alendronato en comparación con el método tradicional de funcionalización.
 - La cantidad máxima de alendronato liberada está relacionada con el número de grupos aminopropilo en la superficie.
3. La electroquímica de la superficie, a través del control de las interacciones *huésped-matriz*, juega un papel principal en la optimización de la dosificación de moléculas biológicamente activas desde matrices mesoporosas ordenadas de sílice. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que:
- La modificación de la carga superficial y la polaridad de la superficie permite modular las interacciones biomolécula-matriz.
 - La adsorción de biomoléculas en estas matrices está relacionado con la electroquímica de la superficie mientras que la liberación depende de aspectos difusionales.
4. La adherencia bacteriana en biocerámicas de base silícea conformadas en forma de discos es superior en los materiales mesoporosos ordenados de sílice SBA-15 y MCM-41 en comparación con vitrocerámicas magnéticas y vidrios bioactivos. Este resultado se debe principalmente a la porosidad intergranular derivada del conformado de los discos así como a la morfología de grano más que a la diferente estructura mesoporosa o parámetros texturales de las distintas biocerámicas.
5. Los materiales mesoporosos ordenados de sílice SBA-15, MCM-41 y MCM-48 muestran un comportamiento mecánico inherentemente frágil. El conformado en piezas tridimensionales de cerámica-polímero empleando el hidrogel agarosa, da lugar a sistemas cerámicos con mayor ductilidad y consistencia elástica evitando la fragilidad de la cerámica y mejorando la resistencia a compresión del hidrogel.

CONCLUSIONS

The results obtained in the part I of this thesis draw the following conclusions:

1. A reliable two-step sol-gel synthesis based on the alkoxide route has been optimized for cell encapsulation within silica hydrogel matrices. The results obtained show that:
 - A high molar ratio water/alkoxide together with the addition of glucose during sol-gel synthesis minimizes silica dissolution and improves the biocompatibility of the encapsulation process.
 - Evaporation of the alcohol released from the hydrolysis of the silica source helps preserving cell integrity.
 - Cells survive the encapsulation process in sol-gel silica. The short term cell viability evaluation by standard methods shows the non-toxicity of the obtained silica.
 - The grouping of cells in clumps has shown to be an efficient method to facilitate cell attachment, thus improving cell viability.
2. The control of the functionalization degree of the surface of ordered mesoporous silica SBA-15 is a key factor to modulate drug alendronate dosage, which is of great importance for the application of these materials as drug delivery systems able to promote bone tissue regeneration. A direct relationship has been found between the alendronate dosage and the matrix functionalization degree. The obtained results show that:
 - The maximum amount of aminopropyl groups that can graft to Si-OH centers is below 50 % out of the total of the matrix surface. This behavior is related to the sterical hindrance derived from the spatial organic group distribution on the silica surface.
 - A gradual modification of the functionalization degree results in a gradual variation of silica textural parameters.
 - The use of a catalyst in a slightly polar medium during post-synthesis grafting induces a more gradual alendronate adsorption in comparison with the traditional grafting method.

- The maximum amount of alendronate released *in vitro* is related to the number of aminopropyl groups on the silica surface.
3. The surface electrochemistry plays a key role in the optimization of biologically active molecules dosage released from ordered mesoporous silica materials. The obtained results show that:
- The modification of surface charge and surface polarity through functionalization allows the modulation of the host-guest interactions.
 - Biomolecule adsorption onto these matrices is related to surface electrochemistry whereas biomolecule release can be approached as a diffusional matter.
4. Ordered mesoporous silica materials SBA-15 and MCM-41 shaped in the form of discs show a higher bacterial adherence compared to other silica-based bioceramics. This observation can be mainly attributed to the intergranular porosity derived from the shaping process, together with grain morphology. However, the mesoporous structures and textural parameters of the different bioceramics do not seem to play a preferential role.
5. Mechanical studies under compression performed on ordered mesoporous silica materials SBA-15, MCM-41 and MCM-48 shaped in the form of discs reveal the inherent brittleness of these ceramics. By combining these bioceramics with the natural hydrogel agarose, ceramic-polymer tridimensional pieces are obtained. This gives place to ceramic systems with higher ductility and elastic consistency, thus improving the mechanical properties of the ceramic component and the compression resistance of hydrogel.



PARTE II. CARBÓN MESOPOROSO ORDENADO

II.1.- ESTADO DEL ARTE

Los materiales porosos de carbono han recibido gran atención gracias a sus potenciales aplicaciones en catálisis, adsorción e inmovilización de biomoléculas, almacenamiento de energía o tratamiento de aguas, entre otras [254]. Para tales aplicaciones, el control de la porosidad es una propiedad fundamental. Es sabido que las estrategias de activación física o química [255,256,257], o la carbonización de resinas y geles orgánicos [258,259,260], producen materiales fundamentalmente microporosos no permitiendo ajustar sus propiedades texturales, limitando pues sus aplicaciones. Así pues, el gran reto consiste en sintetizar materiales de carbono con porosidad ordenada, uniforme y diseñada, ejerciendo a su vez un control sobre la morfología o tamaño de partícula para así adaptar perfectamente sus propiedades a las exigencias concretas de sus posibles aplicaciones. Una técnica para la obtención de materiales porosos de carbono que cumplan con dichos requisitos es la denominada *nanomoldeo*, *nanocasting* o *nanorreplicado* [97,100] la cual se basa en el uso de materiales inorgánicos porosos cuya estructura sirve de molde. En este sentido, el material inorgánico más común empleado como molde es la sílice porosa, aunque también se emplean zeolitas, alúmina e incluso materiales poliméricos.

En concreto, las sílices mesoporosas ordenadas constituyen una nueva generación de plantillas apropiadas para la síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbono con propiedades texturales bien definidas. Así, en este caso el procedimiento de *nanomoldeo* se puede entender como una extensión del concepto de síntesis con plantillas empleado en la preparación de zeolitas y materiales mesoporosos de sílice. En lugar de emplear aminas orgánicas o surfactantes como plantillas consideradas como “blandas”, la idea es emplear los materiales mesoporosos ordenados de sílice como plantillas consideradas como “duras”. El concepto de nanomoldeo ha permitido la preparación de una gran variedad de materiales mesoestructurados tales como metales, óxidos metálicos o sulfuros metálicos, para los que la síntesis mediante el proceso sol-gel presenta limitaciones, siendo los carbones mesoporosos en los que se aplicó este procedimiento por primera vez [261]. Así, en 1999 se sintetizaron los primeros materiales mesoporosos ordenados de carbono (MOCs) [262,263] y la ruta de síntesis empleada entonces es hoy en día el procedimiento estándar de nanomoldeo. De esta manera, el método estándar consiste en la adsorción de un precursor de carbono dentro

de los poros de materiales mesoporosos ordenados de sílice mediante un proceso de impregnación. Tras la polimerización y la carbonización del precursor, las plantillas síliceas se eliminan por disolución. Los MOCs obtenidos conservan la forma y la mesoestructura de las plantillas empleadas y pueden ser considerados como estructuras ordenadas de “nanotubos” de carbono amorfo. Es interesante destacar que la superficie de estos materiales es hidrófoba y por lo tanto más resistente a la hidrólisis en medio acuoso que la de la sílice. No obstante, es posible funcionalizarla mediante la incorporación de heteroátomos, reacciones de oxidación, halogenación, sulfonación, anclaje de nanopartículas o recubrimiento con polímeros que aumenten la hidrofiliidad.

A su vez, los MOCs obtenidos por nanomoldeo pueden utilizarse de nuevo como plantillas para obtener materiales de composiciones diversas, multiplicando así las posibilidades de obtención de materiales mesoestructurados de elevada superficie específica. De manera concreta, en esta tesis se ha empleado la estrategia de nanomoldeo sucesivo con el objeto de obtener hidroxiapatita porosa. La hidroxiapatita es el fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes para tratamiento de tejido óseo, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos. Presenta buenas propiedades como biomaterial tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso. Hasta la fecha, las investigaciones en este campo han estado centradas en el desarrollo de métodos de conformado para obtener biomateriales manipulables con diversas morfologías así como en el control de la macroporosidad para favorecer la integración en el hueso y potenciar su aplicación en ingeniería tisular [173]. Sin embargo, el control de la nano y mesoestructura permitiría incrementar la superficie específica, aumentar su reactividad para aplicación en la regeneración de tejido óseo, y en un futuro mejorar la capacidad de albergar biomoléculas expandiendo así sus aplicaciones en biomedicina [264]. Así, se han propuesto diversas rutas sintéticas para preparar fosfatos de calcio de estructura porosa diseñada, la mayoría basadas en el concepto de nanomoldeo [265,266,267]. De esta manera, actualmente esta línea de investigación constituye un gran reto al que muchos investigadores dedican su esfuerzo.

La parte II de la presente tesis se ha centrado en la síntesis y caracterización de materiales mesoporosos ordenados de carbono obtenidos por el procedimiento de nanomoldeo, el estudio completo de sus propiedades texturales y de la polaridad de su

superficie. Siguiendo la estrategia de nanomoldeo sucesivo, los materiales de carbono sintetizados se han utilizado como plantilla para la síntesis de hidroxiapatita, con el objetivo de mejorar las propiedades texturales de este fosfato de calcio.

II.1.1.- MATERIALES POROSOS DE CARBÓN

De manera general, los materiales de carbono con predominio de microporos presentan elevada superficie específica pero baja accesibilidad a gran parte de la porosidad, al contrario que los carbones macroporosos los cuales presentan porosidades muy accesibles y reducidas superficies específicas. Por su parte, los materiales mesoporosos de carbono presentan una situación intermedia, donde elevadas superficies específicas se combinan con poros accesibles y con numerosas interconexiones. Esta es una situación excelente para numerosas aplicaciones, lo que ha propulsado su estudio generalmente enfocado a la síntesis de estructuras mesoporosas con una mínima participación de microporos.

Para la obtención de carbones mesoporosos se propusieron inicialmente diversas estrategias basadas en la carbonización de resinas de intercambio iónico, polímeros [268,269,270], aerogeles y xerogeles orgánicos [258,271], etc. Sin embargo, se puede decir que estos métodos eran poco sofisticados, ya que no permitían ejercer un control riguroso del tamaño de poro, porosidad o morfología y tamaño de partícula. Esto restringía su aplicabilidad y la de los materiales sintetizados ya que el rendimiento óptimo de un material se consigue cuando sus propiedades se adaptan perfectamente a las exigencias de la aplicación para la cual es diseñado. Para solventar estas limitaciones, la técnica de nanomoldeo con plantilla representa una estrategia muy útil, tal y como se describe a continuación.

II.1.1.1.- Estrategia de *nanomoldeo* con plantillas

La técnica de moldeo permite ejercer un control preciso de las propiedades estructurales de materiales de carbono poroso. Por un lado, permite controlar la estructura interna en lo que a tamaño de poro, grado de porosidad y conectividad entre poros se refiere. Por otro lado, permite ejercer un control sobre las propiedades externas tales como el tamaño y la morfología de partícula. Sin embargo, el inconveniente reside en las numerosas etapas involucradas en el proceso de síntesis.

La estrategia de nanomoldeo contempla dos aproximaciones que se describen a continuación:

- Endomoldeo (*soft templating*): las especies plantilla quedan ocluidas dentro del precursor sólido en formación. La carbonización del precursor y la eliminación de la plantilla da lugar a materiales con poros aislados. Los nanomoldes pueden ser moléculas orgánicas tales como aminas, micelas de surfactante, polímeros, etc. o bien materiales inorgánicos como zeolitas o sílice mesoestructurada. Un claro ejemplo de endomoldeo lo constituye la síntesis de materiales mesoporosos de sílice, en los que las plantillas son moléculas de surfactante, tal y como se describe en la parte I de la presente tesis. No obstante, es preciso destacar que no todas las síntesis mediadas por surfactantes son rutas de nanomoldeo ya que, en muchos casos, se basan en el autoensamblaje cooperativo entre el surfactante y la fase inorgánica y, por lo tanto, no replican ninguna estructura preformada [96].
- Exomoldeo (*hard templating*): un sólido poroso que actúa como plantilla se infiltra con el precursor. La carbonización del precursor y la eliminación de la plantilla origina materiales con porosidad interconectada. Los nanomoldes suelen ser materiales inorgánicos porosos tales como zeolitas, sílice, carbono, membranas de alúmina o cristales coloidales. Mediante esta técnica se han sintetizado materiales de carbono, compuestos inorgánicos (óxidos, fosfatos, etc.), polímeros y metales [272].

Ambos procedimientos se muestran de manera esquemática en la Figura II.1.1.

La síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbono se puede llevar a cabo empleando sílice mesoporosa ordenada como plantilla. Para la obtención de carbón microporoso se han empleado zeolitas como nanomolde [273,274], mientras que para la obtención de carbón macroporoso se han empleado cristales coloidales de sílice o poliestireno [275,276,277,278]. Además, se han sintetizado nanoestructuras de carbono monodimensionales, como nanohilos, empleando membranas de alúmina anodizada [279,280]. En la Figura II.1.2 se muestran algunos ejemplos de materiales de carbón obtenidos mediante la técnica de nanomoldeo con plantillas de base silícea.

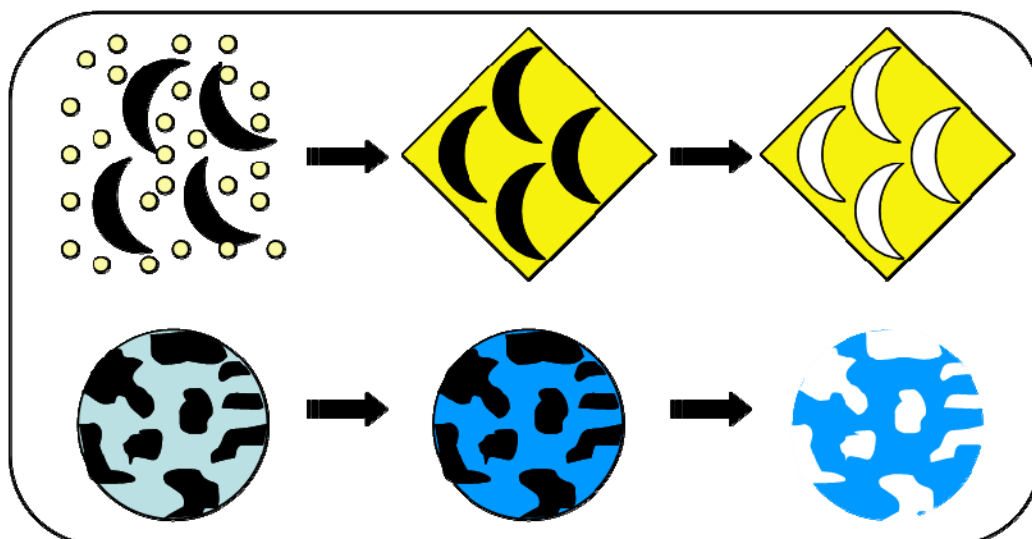


Figura II.1.1. Aproximaciones empleadas en la técnica de nanomoldeo, endomoldeo (arriba) y exomoldeo (abajo). Adaptada de la referencia [100].

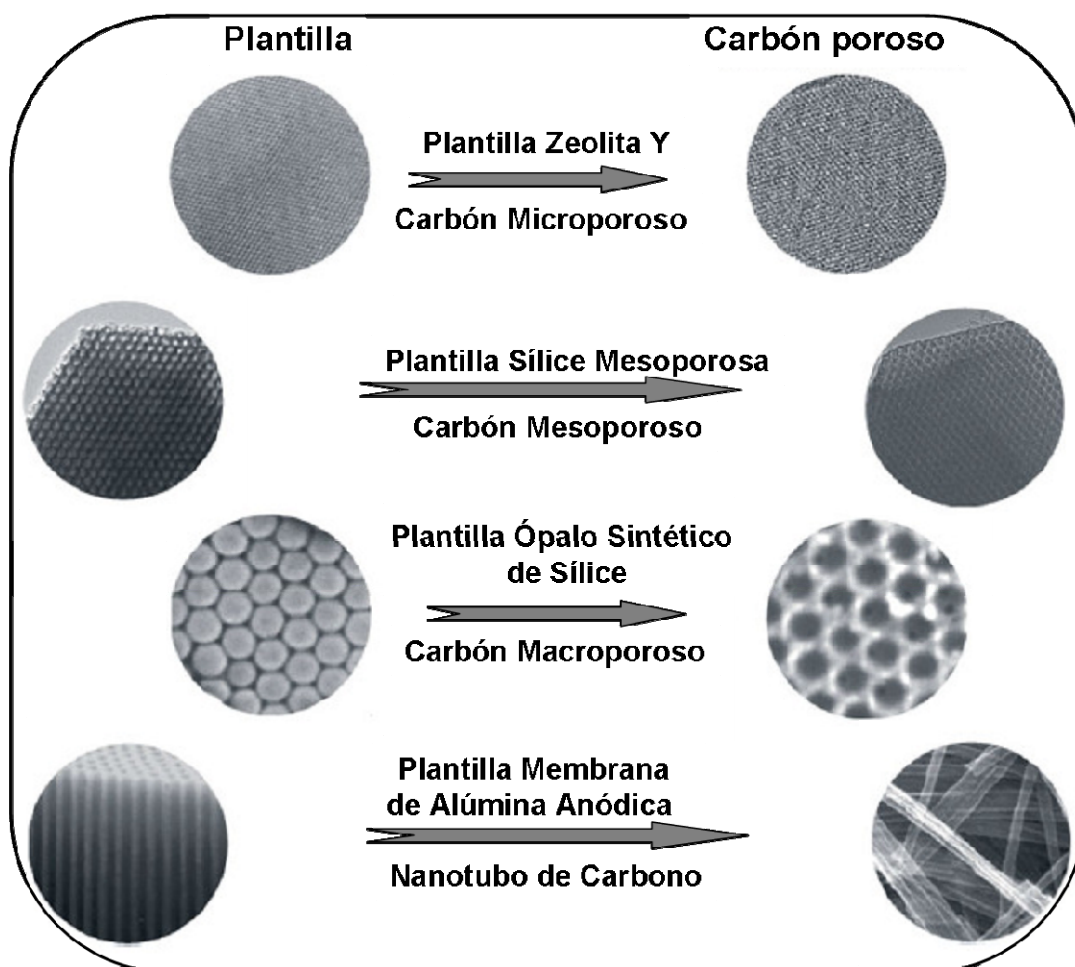


Figura II.1.2. Ejemplos de materiales obtenidos mediante la técnica de nanomoldeo. Adaptada de la referencia [259].

Aunque los primeros materiales obtenidos mediante nanomoldeo fueron de carbón, es interesante destacar que mediante esta técnica es posible obtener sólidos mesoestructurados de diferentes composiciones que incluyen metales, óxidos metálicos o sulfuros metálicos [281] a partir de precursores como cloruros, nitratos y acetatos metálicos o complejos organometálicos, entre otros, no accesibles mediante el proceso sol-gel tradicional. Además, los MOCs obtenidos por nanomoldeo pueden utilizarse de nuevo como plantillas para obtener nuevos materiales de diversas composiciones [100,282] con la ventaja de que el carbón puede eliminarse por simple combustión térmica en condiciones controladas. Desde que se empleara dicha estrategia por primera vez para obtener de nuevo la estructura de la sílice de partida [283,284], se ha utilizado el nanomoldeo sucesivo para sintetizar nuevas estructuras de sílice [285] y otras composiciones como MgO, ZnO, Al_2O_3 o TiO_2 , las cuales son más difíciles de obtener a partir de la tradicional ruta de la síntesis con surfactantes [286,287]. Más adelante en esta introducción se comentará en detalle la obtención de fosfatos de calcio mesoestructurados mediante nanomoldeo sucesivo empleando MOCs como plantillas. La estrategia de nanomoldeo sucesivo para la obtención de materiales porosos mesoestructurados de diversas composiciones se muestra de manera esquemática en la Figura II.1.3.

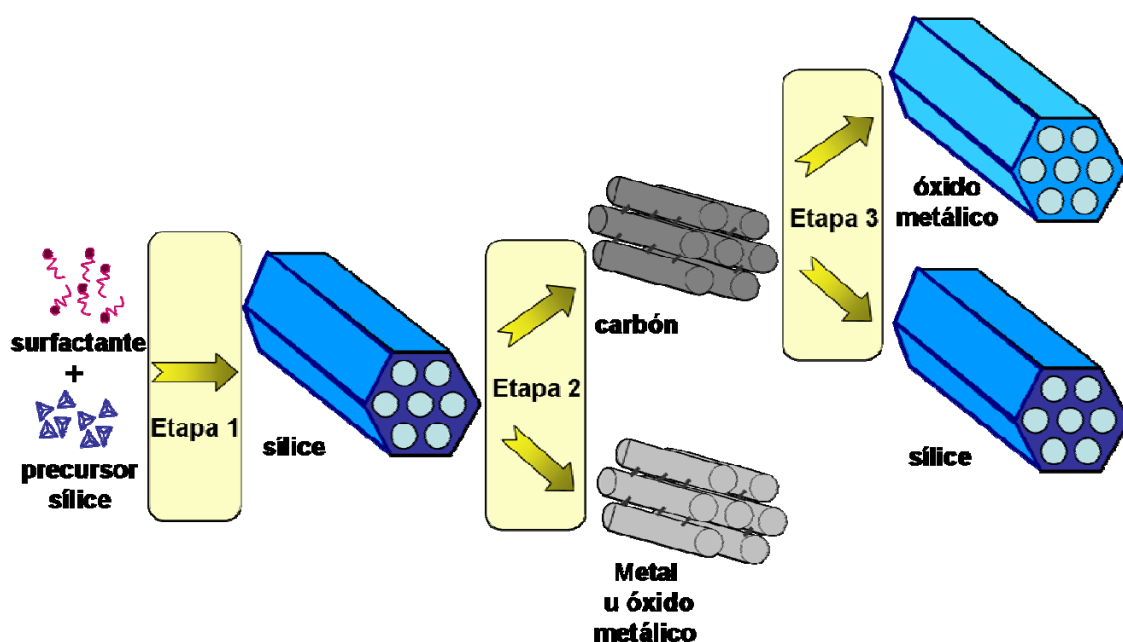


Figura II.1.3. Esquema de nanomoldeo sucesivo para la síntesis de materiales mesoporosos ordenados. La primera etapa consiste en el endomoldeo con plantillas “blandas”. Las siguientes etapas consisten en exomoldeo con plantillas “duras”.

II.1.1.2.- Síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbón

El proceso de nanomoldeo implica tradicionalmente tres etapas: la síntesis de la plantilla, el relleno de la plantilla con el precursor y su conversión, y finalmente la eliminación de la plantilla sin alterar el material final. En la Figura II.1.4 se muestra el esquema del proceso de nanomoldeo empleando materiales mesoporosos ordenados de sílice como plantilla.

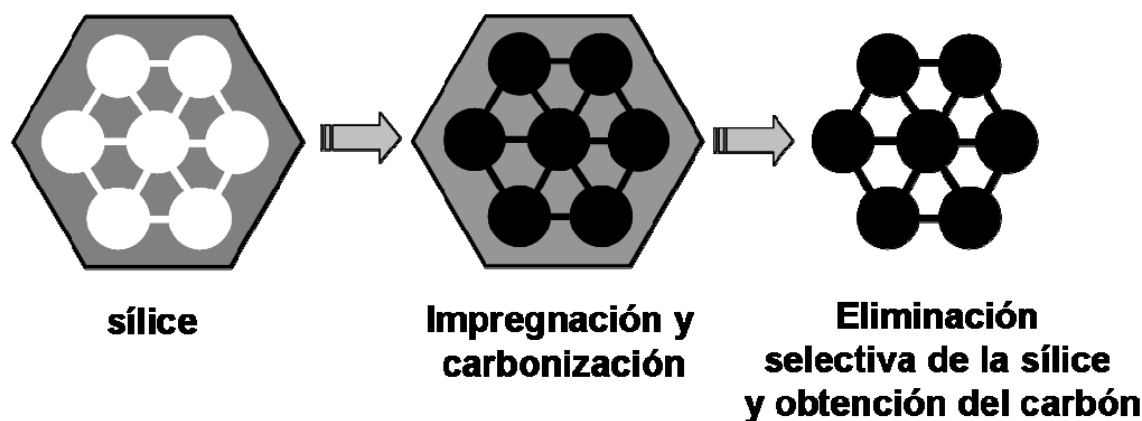


Figura II.1.4. Esquema de nanomoldeo a partir de materiales mesoporosos ordenados de sílice como plantillas.

Gran parte del éxito para obtener un buen grado de mesoestructuración mediante esta técnica reside en ser capaz de controlar la cantidad de precursor incorporado en los poros de la plantilla de sílice [288]. La interacción entre las paredes silíceas y los precursores viene determinada por varios factores basados en interacciones coulómicas, fuerzas de van der Waals, enlace de hidrógeno, etc. Los precursores de carbono a utilizar son variados y las técnicas de introducción del precursor de carbono dentro de la plantilla de sílice incluyen:

- Impregnación con un polímero o pre-polímero en fase líquida. Consiste en el llenado del volumen de poros de la sílice con un líquido que puede ser un polímero o pre-polímero que polimerizará *in situ* con ayuda de un catalizador. Al calentar los precursores en atmósfera inerte, el polímero se descompone transformándose en carbono. En este aspecto, es importante que el polímero deje un alto residuo de carbono durante la carbonización. Algunos precursores de polímeros comúnmente utilizados son sacarosa [263], alcohol furfurílico [289], pirrol [290], poliacrilonitrilo [291]. Como ejemplo de polímeros se

encuentran las resinas fenólicas [262], etc. Para llevar a cabo el proceso de impregnación en fase líquida existen dos técnicas denominadas “impregnación húmeda” (*wet impregnation*, *WI*) e “impregnación por humedad incipiente” (*incipient wetness*, *IW*). El proceso de impregnación húmeda consiste en la dispersión de la matriz en polvo en una disolución diluida, de manera que las especies de precursor disueltas difunden hasta el interior de los poros. Por otro lado, el método de impregnación por humedad incipiente consiste en emplear una disolución saturada de precursor de igual volumen que volumen total de poro de la matriz a impregnar. De esta manera se pretende que el volumen total de la disolución penetre en los poros por capilaridad minimizando así la cantidad de precursor depositada en la superficie externa lo que se traduce en una mejor impregnación. Ambas estrategias se muestran de manera esquemática en la Figura II.1.5.

- Introducción de un pre-polímero en fase vapor mediante VDP (*Vapor Deposition Polymerization*). El pre-polímero se introduce dentro de la porosidad de la sílice en fase vapor y luego polimerizará *in situ*.
- CVD (*Chemical Vapor Deposition*). El carbono se deposita dentro de los poros de la sílice mediante depósito químico en fase de vapor en el que se produce la descomposición térmica de un hidrocarburo (etileno, benceno, etc.) a elevada temperatura [292].

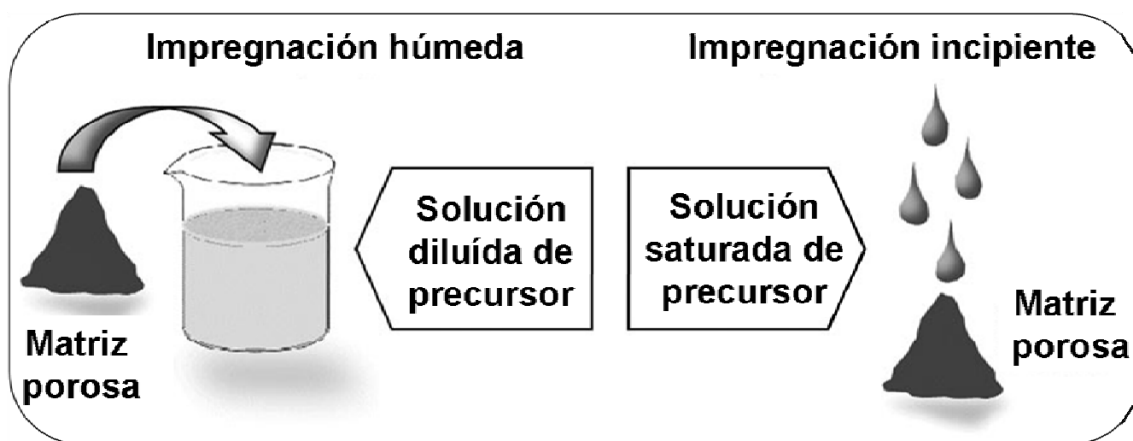


Figura II.1.5. Esquema de las técnicas de infiltración de precursores de carbono en matrices porosas por impregnación en fase líquida. Adaptada de la referencia [282].

Asimismo, mediante el control del grado de impregnación es posible obtener tubos de carbón huecos si en lugar de rellenar por completo los poros de la plantilla, se deposita

solamente una capa de carbón sobre la superficie de las paredes de sílice [293,294,295]. La Figura II.1.6 ilustra ambas estrategias de manera esquemática.

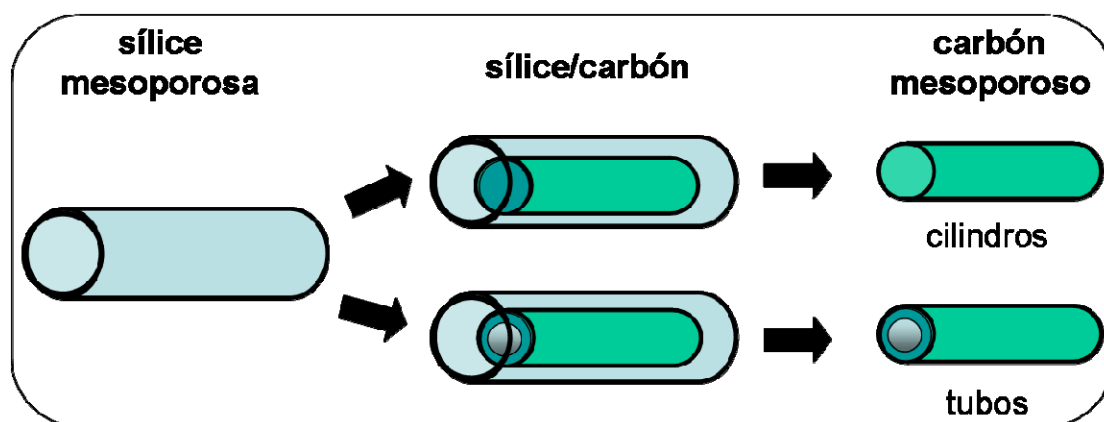


Figura II.1.6. Influencia del grado de infiltración del precursor de carbono en el nanomoldeo de sílice mesoporosa.

La estructura porosa del carbono obtenido suele ser una réplica inversa del material de sílice usado como nanomolde, así el esqueleto del material inorgánico constituirá la porosidad del carbono tras el replicado. Además, el material final replica tanto la mesoestructura como la morfología y el tamaño de partícula del molde. Por ello, la elección de la sílice empleada como plantilla condicionará la estructura porosa del carbono obtenido. Las plantillas de sílice se eliminan por disolución en disoluciones de sosa (NaOH) o ácido fluorhídrico (HF), por lo que las réplicas han de ser estables frente a estos agentes químicos. Entre los materiales de sílice a emplear como plantilla se encuentran los geles de sílice obtenidos por el proceso sol-gel tradicional [296] así como los materiales mesoporosos ordenados de sílice. Asimismo, los carbones obtenidos pueden ser altamente ordenados, presentando estructuras periódicas, o bien desordenados [297]. Para obtener una réplica de carbón mesoporoso ordenado ha de existir, por lo general, una interconexión entre los poros de la sílice mesoestructurada empleada como plantilla, por ejemplo en forma de sistemas complementarios de poros que interconecten poros principales. Este efecto se muestra en la Figura II.1.7.

La primera síntesis de carbón mediante nanomoldeo se realizó en 1982 a partir de geles de sílice y vidrios porosos como plantilla [298] dando lugar a estructuras desordenadas, de acuerdo con el desorden estructural de las plantillas empleadas. En 1999 se llevó a cabo la primera síntesis de un material mesoporoso ordenado de carbón de manera independiente por parte de dos grupos de investigación [262,263]. Estos materiales

poseen elevadas superficies específicas de hasta $2500 \text{ m}^2/\text{g}$ y volúmenes de poro de hasta $2 \text{ cm}^3/\text{g}$. Gracias a estas características, su estructura ordenada y a su estabilidad hidrotérmica, química y mecánica, los carbones mesoporosos ordenados reciben gran atención en campos como adsorción, catálisis, óptica, electrónica o biomedicina [97]. La Tabla II.1.1 muestra un resumen de varios de los carbones sintetizados a partir de plantillas de sílice mesoestructurada.

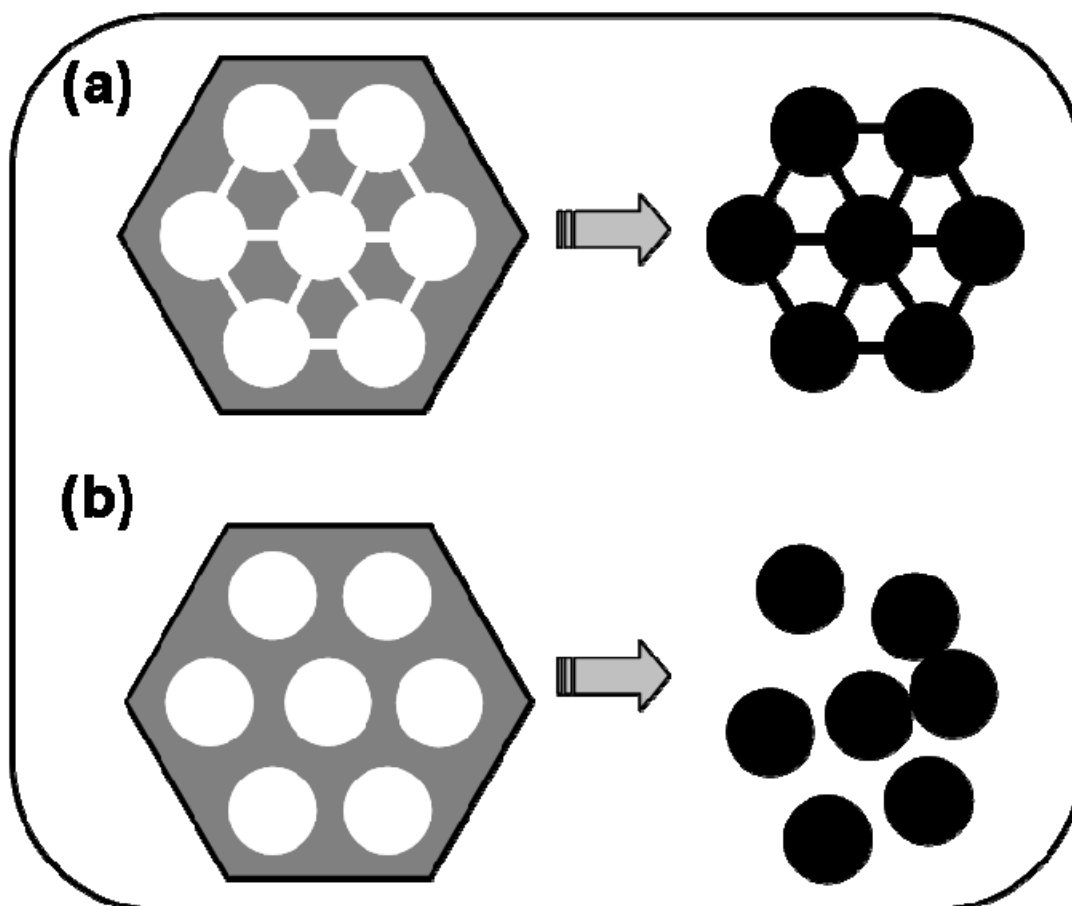


Figura II.1.7. Importancia de una red conectada de poros para obtener una réplica inversa de carbón. Carbón obtenido con estructura (a) ordenada o (b) desordenada.

La investigación más reciente en materiales mesoporosos ordenados de carbono se centra en la síntesis de nuevas estructuras ordenadas y nuevas estrategias de síntesis para el control del tamaño de poro, la morfología y la mesoestructura, así como en el estudio detallado de las características microestructurales de sus superficies mediante las técnicas de microscopía electrónica de alta resolución (*HRTEM*), adsorción de nitrógeno, difracción de rayos X (*XRD*) o espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (*XPS*) [299,300,301].

Tabla II.1.1. Resumen de algunos de los materiales mesoporosos ordenados de carbono (MOC) descritos.

MOC	Grupo espacial	Plantilla	Grupo espacial	Precursor
CMK-1	$I4_1/a$	MCM-48	$Ia3d$	sacarosa resina fenólica
CMK-2	cúbica	SBA-1	$Pm3m$	sacarosa
CMK-3	$p6mm$	SBA-15	$p6mm$	sacarosa
		HMS		sacarosa
CMK-3 (análogo)		MSU-H	$p6mm$	resina fenólica
		SBA-3		alcohol furfurílico
CMK-4	$Ia3d$	MCM-48	$Ia3d$	acetileno
CMK-5	$p6mm$	SBA-15	$p6mm$	alcohol furfurílico
NCC-1	$p6mm$	SBA-15	$p6mm$	alcohol furfurílico
N-MOC	$p6mm$	SBA-15	$p6mm$	acrilonitrilo pirrol pirrol
G-CMK-3	$p6mm$	SBA-15	$p6mm$	cloruro de polivinilo benceno acenafteno
MOC (cúbica)	$Ia3d$	KIT-6	$Ia3d$	sacarosa
		FDU-5		alcohol furfurílico
MOC (cúbica)	—	FDU-12	$Fm3m$	sacarosa
				sacarosa
MOC (cúbica)	$Im3m$	SBA-16	$Im3m$	alcohol furfurílico acenafteno

En comparación con los materiales de sílice mesoporosa, no existen métodos directos para el control del tamaño de poro de los carbones mesoporosos ordenados [302] ya que éste depende del espesor de la pared de la plantilla de sílice. El método más sencillo para modular el tamaño de poro de los carbones mesoporosos es modificar las condiciones de síntesis de la sílice porosa de partida [303]. En particular, el incremento en la temperatura de síntesis de la sílice permite aumentar uniformemente el espesor de

pared de la sílice usada como nanomolde [304]. Además, se ha observado que la dosificación de la cantidad de precursor de carbono infiltrado permite obtener carbones mesoporosos con uno o dos sistemas de poros [289,305].

En cuanto al control de la morfología, es posible obtener esferas o cápsulas de carbono, materiales idóneos para ser usados como *nanocontenedores* en aplicaciones como liberación de fármacos o transporte de biomoléculas [306] o cilindros que se adaptan bien para su utilización en sistemas con apertura-cierre de poros bajo estímulos externos [307]. Además, también se han obtenido monolitos de carbono, más fáciles de manipular que los materiales en polvo. Los monolitos suelen fabricarse por extrusión o a través del proceso sol-gel, con la dificultad que existe para obtener sílice sol-gel sin roturas durante el proceso de secado. Su porosidad se puede modular y obtener materiales meso/macro porosos mediante adición de porógenos durante la síntesis [258,308,309,310,311].

La búsqueda de nuevas rutas de síntesis que simplifiquen el proceso tradicional de nanomoldeo, por ejemplo a través de la reducción en el número etapas implicadas, ha conducido al desarrollo de métodos basados en el autoensamblaje cooperativo de surfactantes con precursores de carbón basados en mezclas de polímeros con diferente estabilidad térmica [312,313] en los que durante la etapa de carbonización se elimina también la plantilla. Los enlaces de hidrógeno existentes entre el surfactante y el precursor de carbón (resinas fenólicas) son la fuerza motriz para la formación de la mesoestructura ordenada [314]. Esta ruta permite la obtención de geles de carbono [258] y de materiales en forma de monolitos o películas [315].

La superficie de los materiales ordenados de carbono (MOCs) es de naturaleza inerte e hidrófoba lo cual puede suponer una limitación para sus aplicaciones en fase líquida. Por ello, es común modificarla mediante tratamientos térmicos o químicos que crean grupos oxigenados que dan lugar a centros primarios de adsorción de moléculas de agua que a su vez adsorberán nuevas moléculas por formación de enlaces de hidrógeno. De esta forma se aumenta el carácter hidrófilo y la “mojabilidad” del carbón [316]. El método de modificación de la superficie de los materiales de carbono es algo más complicado en comparación con lo que ocurre en los materiales silíceos e implica generalmente tratamientos de oxidación en fase líquida o gaseosa con ácido nítrico (HNO_3) u ozono (O_3) que permiten generar grupos ácido carboxílico, éster, quinona o

anhídrido. La desventaja de esta técnica subyace en los bajos grados de funcionalización alcanzados y en la corrosión de la superficie del carbono durante el tratamiento oxidativo [317]. La funcionalización de los MOCs no es una técnica sencilla debido a que la estructura ordenada puede colapsar durante el tratamiento oxidativo [318]. No obstante, existen modos alternativos de modificar la hidrofobicidad de la superficie del carbón, por ejemplo mediante carbonización hidrotermal [319]. Esta técnica consiste en crear carbones hidrófilos a partir de carbohidratos solubles en agua en unas condiciones suaves de presión y temperatura. Por otro lado, el gran número de estudios realizados para la modificación de la superficie de nanotubos de carbono ha permitido desarrollar nuevos métodos de gran eficacia para modificar covalentemente la superficie del carbono tales como la reacción con compuestos aromáticos de diazonio, carbenos o nitrenos, la fluoración o la reducción con compuestos de litio [320,321]. De esta manera se abren nuevas rutas para obtener superficies de carbono con reactividad y afinidad definida para aplicaciones concretas.

II.1.1.3.- Aplicaciones de materiales mesoporosos ordenados de carbón

Los materiales mesoporosos ordenados de carbono se emplean ampliamente para almacenamiento de gases [322], electrodos de condensadores de doble capa [262], soporte de electrocatalizadores en pilas de combustible [323], sensores [324], catálisis [325] o adsorción de enzimas, proteínas, fármacos, etc. [326,327,328]. En muchas de estas aplicaciones se venían utilizando otras formas de carbón poroso, sin embargo los carbones mesoporosos ordenados con propiedades texturales definidas, presentan ventajas adicionales.

En cuanto a las propiedades electrónicas de los materiales de carbón, estas se relacionan con su carácter grafitico [329]. Por definición, el carbono no grafitico presenta una estructura con orden bidimensional de átomos de carbono en láminas planas hexagonales, sin ningún orden cristalográfico en la tercera dimensión (dirección *c*), aparte del hecho de que las láminas sean más o menos paralelas. Este carbón puede, en la mayoría de los casos, ser grafitizable mediante por térmico a temperaturas de hasta 3000 °C a presión atmosférica. La mayoría de los MOCs descritos presentan paredes amorfas ya que por su estabilidad térmica no soportan las elevadas

temperaturas requeridas para la grafitización. Aun así, se han descrito estrategias que permiten obtener estructuras gráficas [290,330,331,332,333].

Por otro lado, el hecho de que la porosidad esté constituida por poros relativamente grandes, permite la inserción de otros materiales (polímeros, nanopartículas, etc.) sin colapso de la red porosa. Así es posible obtener materiales funcionales tales como híbridos carbono-polímero [334] o carbono mesoporoso magnético [335,336,337,338,339,340] aplicable como adsorbentes fácilmente separables de la disolución o para tratamientos de hipertermia o liberación de fármacos en biomedicina.

Los materiales porosos de carbono son adsorbentes por excelencia. Se han empleado como fase estacionaria en cromatografía [341] o para eliminar arsénico o moléculas de tintes en aguas [328]. Sin embargo, el mayor atractivo quizás resida en su capacidad para adsorber moléculas de gran tamaño como enzimas lo que permite su aplicación en biosensores, catálisis enzimática, biomedicina o industria alimentaria. Así, se han llevado a cabo estudios del comportamiento de adsorción de biomoléculas tales como citocromo *c* [326], lisozima [342], histidina [343] y vitamina E [344] sobre carbón mesoporoso demostrando que los materiales mesoporosos de carbono tienen una capacidad muy superior para la adsorción de sustancias hidrófobas en comparación con la sílice mesoporosa y el carbón activado. Además la estabilidad térmica, mecánica y en medio acuoso son mejores que las de la sílice. Por otro lado, su superficie no está cargada, lo cual es una ventaja para evitar la desnaturalización de las proteínas adsorbidas.

A continuación se describen algunos ejemplos de materiales de carbono con aplicaciones clínicas. Dentro de la categoría de las cerámicas bioinertes, encontramos el carbón en distintas formas alotrópicas: grafito, diamante, carbón tipo vidrio y carbón pirolítico. El carbón tipo vidrio (*glassy carbon*) es un carbón no grafitizable monolítico con una muy elevada anisotropía de sus propiedades físicas y estructurales y con una permeabilidad muy baja a líquidos y gases, debido a su prácticamente nula porosidad (a diferencia del resto de carbones no grafitizables). Las superficies originales y de fractura tienen una apariencia pseudovítrea. Este tipo de carbones combinan ciertas propiedades de los vidrios y los materiales cerámicos con las del grafito. Los carbones vítreos tienen una gran resistencia térmica y son extremadamente resistentes al ataque químico (más incluso que el grafito). Los carbones vítreos tienen una gran variedad de

aplicaciones, fundamentalmente como electrodos para procesos electroquímicos, pero también como crisoles y otros materiales diversos como prótesis e implantes dentales. El carbón pirolítico (*PyC*) es un grafito sintético altamente ordenado obtenido mediante depósito químico de hidrocarburos en fase de vapor. Es la forma de carbón más utilizada en implantes. Es un componente de válvulas cardiacas y que está presente también en pequeñas uniones ortopédicas ya que no favorece la aparición de trombos y tiene buena resistencia a la fatiga mecánica [345].

Recientemente, se han explorado las potenciales aplicaciones biomédicas de formas alotrópicas de carbono tales como nanotubos o fullerenos (*buckyballs*). Se sabe que los nanotubos y fibras de carbono se emplean, entre otras cosas, como sistemas para la liberación de fármacos o como refuerzo mecánico de biomateriales [346,347,348,349,350]. Sin embargo, aún existe cierta controversia en cuanto a su biocompatibilidad ya que mientras que ciertos estudios *in vitro* han demostrado la toxicidad de los nanotubos de carbono [351,352], otros muestran que son sustratos excelentes para el crecimiento celular [353,354,355,356]. Parece que existen muchos factores a considerar tales como la forma y tamaño de los nanotubos, el tipo celular ensayado, la aplicación concreta para la que se diseñan, la modificación química de su superficie, etc.

Por otro lado, el carbón activado es el adsorbente más utilizado para el tratamiento de casos de envenenamiento, intoxicación o diarrea [357] y por lo tanto no se considera tóxico. En cuanto a los materiales mesoporosos de carbono, estudios celulares con nanopartículas (150 nm) de carbón mesoporoso demuestran la biocompatibilidad de estos materiales y su internalización por parte de las células [358]. Así pues, parece que el tamaño de partícula afecta decisivamente en la biocompatibilidad de estos materiales. Sin embargo, es preciso investigar más en este aspecto ya que en muchos casos, los riesgos del carbón activado y nanotubos no son causados por ingestión sino por inhalación, pudiendo provocar fibroblastomas en el pulmón al quedar retenidos en los alveolos [359,360].

Recientemente ha resurgido el interés en la aplicación de los carbones porosos para la purificación de bio-fluidos en dispositivos médicos de tratamiento extracorporeal para la disfunción renal (diálisis), enfermedades autoinmunes y sepsis [361]. Su función

consiste así en limpiar la sangre de mediadores de la inflamación como son las citoquinas [362,363,364,365]. Estos materiales presentan una serie de ventajas frente a los polímeros ya que son materiales rígidos que no se disuelven, permiten unas condiciones de flujo más estable, y tienen una composición química muy definida. Así pues, tras el estudio de la posible citotoxicidad de los carbones porosos en estas aplicaciones, se sabe que es preciso controlar la procedencia del carbón, en lo que a la fuente de carbono se refiere, el tamaño de partícula, así como emplear polímeros tales como celulosa como recubrimiento para así aumentar su biocompatibilidad en contacto con fluidos fisiológicos [366].

II.1.2.- HIDROXIAPATITA

II.1.2.1.- Fosfatos de calcio tipo apatita

Los fosfatos de calcio son los principales constituyentes inorgánicos de los tejidos duros biológicos tales como dientes o huesos. Se emplean como materiales cerámicos en el campo de la medicina ortopédica y dental así como en la industria alimentaria como aditivos, en dentífricos, como estabilizantes para plásticos o como fertilizantes.

El fosfato de calcio más utilizado en la práctica clínica es la *hidroxiapatita* $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA), debido a que es el material más similar al componente mineral del hueso [367]. Presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como, biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y enlace directo con el hueso [1]. La fase tipo apatita biológica, tal y como se encuentra en los huesos, está formada por cristales de tamaño nanométrico y su estructura presenta sustituciones iónicas. Los parámetros químicos más importantes en los fosfatos de calcio son la relación molar entre la cantidad de calcio y la de fósforo (Ca/P), la acidez/basicidad y la solubilidad [368]. La Tabla II.1.2 muestra varios fosfatos de calcio con sus respectivas relaciones Ca/P.

Hasta el momento, se han propuesto diversas rutas para la síntesis de hidroxiapatita, debido a la dificultad de obtener este compuesto con la estequiometría, cristalinidad y morfología deseadas [369]:

- Métodos de vía seca, empleando reacciones en estado sólido. Consiste en la mezcla de reactivos sólidos y posterior tratamiento térmico para la difusión de iones entre los reactivos sólidos [370].
- Métodos de vía húmeda. Se basan en la precipitación de los reactivos en disolución [371,372,373] o la hidrólisis de sales inorgánicas y/o alcóxidos como ocurre en el proceso sol-gel [374,375,376]. El método de cristalización controlada permite la obtención de hidroxiapatita nanocristalina, más parecida a la de origen biológico [377,378].
- Métodos hidrotermales, basados en la aplicación de altas temperaturas y presiones a disoluciones acuosas para facilitar la obtención de cristales de mayores dimensiones que los obtenidos mediante métodos tradicionales de vía húmeda. La principal ventaja de estos métodos es la obtención de un producto con elevada cristalinidad y pureza [379,380].
- Otros métodos incluyen pirólisis con llama [381], microemulsiones [382], microondas [383], ultrasonidos [384], combustión autopropagante [385], mecanoquímica o pirólisis de aerosoles [386].

La hidroxiapatita se ha utilizado en el recubrimiento de prótesis metálicas, donde se combinan las buenas propiedades mecánicas del metal con la biocompatibilidad de la hidroxiapatita, para el relleno de pequeños defectos óseos aprovechando sus propiedades osteoconductoras, o como fase reforzante de materiales compuestos cerámica-polímero [387,388]. Además de sus aplicaciones biomédicas, tiene aplicaciones potenciales en sensores y pilas de combustible gracias a su conductividad iónica de protones [389] así como en catálisis [390].

Tal y como ha sido ampliamente descrito en la parte I de la presente tesis, un valor añadido en la fabricación de implantes cerámicos reside en la posibilidad de incluir fármacos de manera que se liberen de forma gradual directamente en la zona del implante, aprovechando su acción allí donde es necesaria sin afectar otras partes del organismo. Al igual que en el caso de los materiales mesoporosos ordenados de sílice, ser capaces de obtener fosfatos de calcio con propiedades texturales adecuadas ofrecería numerosas ventajas para su aplicación en biomedicina. Por ello, las investigaciones actuales se centran en controlar la morfología y la estructura de estos materiales, características que, junto con la estequiometría, la cristalinidad o el tamaño de cristal

son importantes en el comportamiento físico, químico y biológico de la hidroxiapatita sintetizada.

Así pues, considerando las numerosas aplicaciones de la hidroxiapatita, se ha descrito la síntesis de materiales de diferentes morfologías como monolitos cerámicos o nanoestructuras porosas [391], entre otras. Cabe destacar el interés que ha despertado el diseño de nuevos métodos para la obtención de hidroxiapatita mesoporosa.

Tabla II.1.2. Varios fosfatos de calcio con sus respectivas relaciones Ca/P. Adaptada de la referencia [368].

Nombre	Abreviatura	Fórmula	Ca/P
Fosfato tetracálcico	TetCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2.00
Hidroxiapatita	HA (OHAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	—
Fosfato tricálcico (α , β , γ)	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Fosfato dicálcico dihidrato (brushita)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00
Fosfato dicálcico (monetita)	DCP	CaHPO_4	1.00
Pirofosfato de calcio (α , β , γ)	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1.00
Pirofosfato de calcio dihidrato	CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00
Fosfato heptacálcico	HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0.70
Fosfato tetracálcico diácido	TDHP	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0.67
Fosfato cálcico monohidrato	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50
Metafosfato de calcio (α , β , γ)	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0.50

II.1.2.2.- Obtención de hidroxiapatita combinando el método de precipitación con el proceso de nanomoldeo

La superficie específica obtenida para fosfatos de calcio mediante rutas tradicionales de síntesis oscila entre 20-30 m²/g. La síntesis de hidroxiapatita con poros de tamaño nanométrico mejora sus propiedades mecánicas ya que favorece la sinterización debido a la mayor superficie específica [392]. Además, el control de sus propiedades texturales hace posible mejorar su reactividad para su aplicación en la regeneración de tejido óseo. Asimismo, el control de su porosidad también supondría una ventaja adicional para alojar biomoléculas de tamaño variable. Para controlar la estructura de los fosfatos de calcio, y en particular de la hidroxiapatita, es posible emplear la estrategia de nanomoldeo en combinación con rutas tradicionales de síntesis de fosfatos de calcio.

Hasta la fecha, los métodos comúnmente utilizados han estado basados en el empleo de plantillas de surfactante [265,393,394,395,396,397], tratando de imitar el esquema de síntesis de los materiales mesoporosos ordenados de sílice. De esta manera se han empleado tanto surfactantes aniónicos como catiónicos, con la inherente dificultad de equilibrar las interacciones electrostáticas de los grupos fosfato con los iones calcio y con el surfactante. Mediante esta ruta, se han obtenido superficies específicas de hasta 140 m²/g [398] y generalmente mesoestructuras lamelares o *wormhole-like* [399]. Otra estrategia consiste en usar organofosfatos como fuente de fósforo y como plantilla obteniendo estructuras lamelares [400,401]. Sin embargo, uno de los problemas más comunes es la obtención de mezcla de fases cristalinas [402] así como el colapso de la estructura tras la eliminación del surfactante [403]. No obstante, aunque la existencia de fases secundarias con mayor solubilidad aumenta la biodegradabilidad de la hidroxiapatita, este efecto podría suponer una ventaja por ejemplo para favorecer la liberación de fármacos desde estas matrices.

Para obtener hidroxiapatita porosa de tamaño de poro uniforme se han utilizado también microesferas de poliestireno o de látex [391,404], esferas de sílice [405] o incluso ovoalbúmina [406] o levaduras [407] como plantilla. Otras rutas no basadas en la técnica de nanomoldeo se han centrado en el empleo de emulsiones dobles como microreactores [408] obteniéndose las superficies específicas más elevadas hasta ahora

descritas ($170 \text{ m}^2/\text{g}$), así como en la disolución-reprecipitación de soluciones que dan lugar a la formación de mesoporos [409].

Finalmente, se ha descrito recientemente el empleo de carbones mesoporosos ordenados como plantillas “duras” para el nanomoldeo de fosfatos de calcio mesoporoso [410,411]. Dado el gran número de estructuras de carbón mesoporoso que es posible sintetizar, sería interesante estudiar el efecto de la distinta plantilla de carbón empleada en las propiedades texturales de los fosfatos de calcio obtenidos. Es esta la idea que se ha puesto en marcha para la síntesis de fosfatos de calcio por nanomoldeo empleando carbón mesoporoso, y que se describe más adelante.

II.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1.- MATERIALES DE SÍLICE

II.2.1.1.- Síntesis de SBA-15

El material mesoporoso ordenado de sílice SBA-15 se ha sintetizado de acuerdo con el método descrito por Zhao *et al.* [67]. En una síntesis habitual, se disuelven 4 g del copolímero de bloque Pluronic[®] P123 (PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀, $M = 5750$, BASF Co.), que actúa como agente director de estructura, en 104 ml de agua bidestilada y 20 ml de ácido clorhídrico (HCl 37 % p/p, Panreac). Se mantiene la disolución en agitación a 40 °C hasta que el surfactante se ha disuelto completamente. A continuación se adicionan 9.16 ml de tetraetilortosilicato, (Aldrich), que actúa como fuente de silicio, obteniéndose una mezcla de composición molar 1.0 SiO₂ :0.017 P123: 5.83 HCl :161 H₂O que se introduce en recipientes de Teflon[®] herméticamente cerrados y se calienta a 40 °C durante 20 horas en agitación. A continuación el gel se introduce en autoclaves y se envejece a 100 °C durante 24 horas en condiciones estáticas. Transcurrido este tiempo, se separa el producto sólido por filtración, se lava con agua bidestilada y se seca al aire a 60 °C durante 24 horas obteniendo un sólido blanco pulverulento. La eliminación del surfactante se realiza por calcinación a 550 °C en corriente de nitrógeno durante 1 h con una rampa de calentamiento de 5 °C/min, seguida de tratamiento durante 3 h en atmósfera de aire a la misma temperatura. La completa eliminación del surfactante se ha comprobado mediante análisis químico y análisis termogravimétrico.

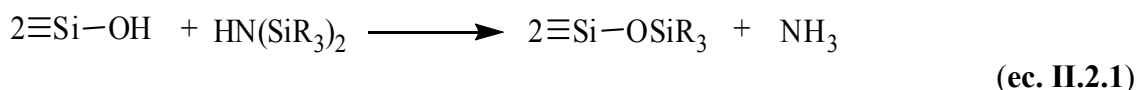
II.2.1.2.- Síntesis de MCM-48

El material MCM-48 se ha sintetizado de acuerdo con el método descrito por Kim. *et al.* [412]. Sobre 7.5 g de sílice coloidal Ludox AS40 (Aldrich, 40 %) precalentada a 70 °C, se añade lentamente y con agitación magnética vigorosa una disolución de NaOH 1M obteniéndose una mezcla de composición molar 0.25 Na₂O:1.00 SiO₂:12.5 H₂O que se agita durante 1 h a 70 °C para obtener una disolución transparente de silicato de sodio. La disolución se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente. Por otro lado, se disuelven 18.22 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTABr, Aldrich) en una mezcla de agua bidestilada y etanol para dar lugar a una disolución de composición molar 1.0 HTABr: 5.0 EtOH: 120 H₂O. A continuación, la disolución de sílice

previamente preparada se añade gota a gota y con agitación magnética vigorosa sobre la disolución de surfactante. La mezcla resultante, de composición molar 1.4 SiO₂: 1.0 HTABr: 0.35 Na₂O: 5.0 EtOH: 144 H₂O, se vierte en autoclaves de Teflon[®] y se somete a tratamiento hidrotermal a 100 °C durante 5 días en condiciones estáticas. Finalmente, el producto obtenido se filtra y lava con agua bidestilada y se seca al aire a 100 °C durante 12 horas. El surfactante se elimina mediante calcinación, por un tratamiento de 1 h a 550 °C en corriente de nitrógeno seguido de tratamiento a la misma temperatura durante otras 6 h en atmósfera de aire. La completa eliminación del surfactante se ha comprobado mediante análisis químico y análisis termogravimétrico.

II.2.1.3.- Funcionalización de materiales de sílice

El material de sílice SBA-15 se ha funcionalizado por reacción post-síntesis de los grupos silanol de la superficie con grupos trimetilsilil (TMS) empleando el reactivo hexametildisilazano (HMDS, Aldrich 99 %). En la reacción, cada molécula de agente funcionalizante da lugar a dos grupos -Si(CH₃)₃ en la superficie tal y como se muestra a continuación [413]:



En una reacción de funcionalización habitual, se deshidrata 1 g de material mesoporoso de sílice calcinado mediante tratamiento a 120 °C en vacío durante 12 horas. A continuación, se deja enfriar el sistema y se añaden 50 ml de ciclohexano anhidro (Aldrich 99.5 %) como disolvente. La mezcla se agita durante 30 minutos y a continuación se añaden 2 g del reactivo HMDS (12 mmol HMDS/g sílice) disueltos en 20 ml de ciclohexano anhidro. Tras mantener el sistema en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, el producto se filtra, se lava con ciclohexano y metanol y se seca en atmósfera de aire a 60 °C durante 24 horas. El material de sílice funcionalizado obtenido se ha denominado **SBA-15-HMDS**.

II.2.2.- MATERIALES DE CARBÓN

II.2.2.1.- Síntesis de CMK-3 a partir de SBA-15

II.2.2.1.1.- Impregnación con sacarosa

La Figura II.2.1 muestra de manera esquemática la ruta de síntesis seguida para la obtención de los materiales mesoporosos ordenados de carbón por nanomoldeo de materiales mesoporosos ordenados de sílice mediante impregnación con sacarosa.

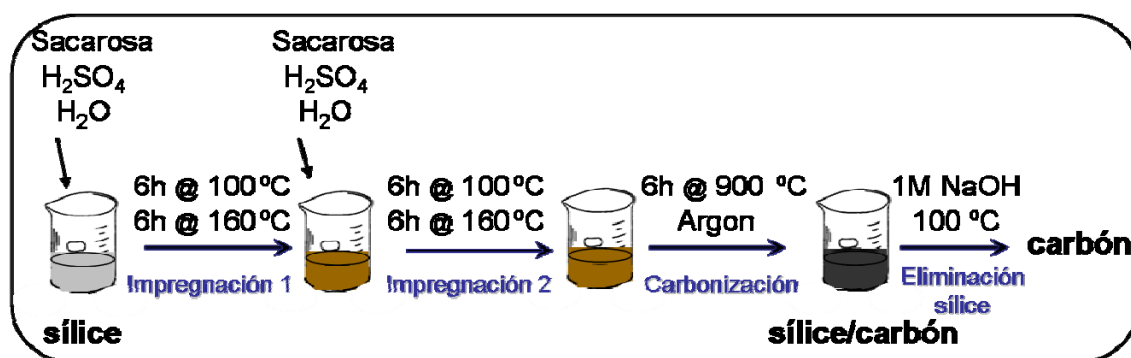


Figura II.2.1. Esquema del proceso de síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbón mediante nanomoldeo con plantillas de materiales mesoporosos ordenados de sílice empleando sacarosa como fuente de carbono. Adaptada de la referencia [414].

La síntesis del material mesoporoso de carbono denominado **CMK-3** se ha llevado a cabo por impregnación del material mesoporoso de sílice SBA-15 calcinado con una solución acuosa de sacarosa y ácido sulfúrico [415]. En una síntesis habitual, se impregna 1 g de SBA-15 con una disolución de 1.25 g de sacarosa y 0.14 g de H_2SO_4 (Aldrich 98 %) en 5 g de H_2O bidestilada. La mezcla se somete a tratamiento térmico a 100 °C durante 6 horas seguido de un tratamiento a 160 °C durante otras 6 h. Como consecuencia de la polimerización parcial de la sacarosa, la muestra se torna de color marrón negruzco. Para asegurar una correcta impregnación, se repite el tratamiento térmico una vez más, previa adición de 0.8 g de sacarosa, 0.09 g de H_2SO_4 y 5 g de H_2O . Finalmente, la carbonización se completa mediante pirólisis a 900 °C en un horno tubular en el que la muestra se coloca en un crisol de alúmina en el interior de un tubo de cuarzo perfectamente sellado con uniones herméticas Swagelok® bajo una corriente de argón de alta pureza. El composite de sílice/carbón obtenido tras la pirólisis se lava con una disolución de NaOH 1M (50 %vol. etanol–50 %vol. H_2O) a 100 °C. De manera

alternativa, la plantilla de sílice se ha eliminado mediante lavado con una disolución de ácido fluorhídrico (HF) 5 %p/p a temperatura ambiente o con una disolución de KOH 6M a 180 °C [416]. Finalmente, el carbón libre de plantilla silícea se filtra, se lava con etanol y se seca a 120 °C en atmósfera de aire durante 12 horas. La completa eliminación de la sílice se comprueba mediante análisis termogravimétrico.

Cabe mencionar que la incorporación del precursor de carbono se ha llevado a cabo mediante impregnación por humedad incipiente. Este método, en comparación con el método de impregnación tradicional, conduce a una mejor penetración del precursor en los poros del material de sílice, minimizando la cantidad de sacarosa remanente en la superficie externa, lo cual permite la obtención de materiales ordenados de carbón de mejor “calidad”. Así, en una síntesis habitual los materiales de sílice calcinados se deshidratan a 120 °C a vacío en el matraz de reacción cerrado con *septum* durante 12 h. A continuación, se deja enfriar el sistema y se “rompe” el vacío inyectando con jeringa la disolución del precursor de carbón. Para favorecer la penetración de la disolución en los poros, se mantiene el sistema en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos para seguidamente someter el material al tratamiento térmico en dos etapas anteriormente descrito y completar así los dos ciclos de impregnación requeridos. Finalmente, los materiales mesoporosos ordenados de carbono se obtienen tras la pirólisis y la eliminación de la plantilla de sílice.

II.2.2.1.2.- Síntesis directa

En el método de síntesis directa de materiales mesoporosos de carbón, el copolímero de bloque Pluronic P123 ejerce una doble función como agente director de estructura a la vez que como fuente de carbono [417]. La Figura II.2.2 muestra una representación esquemática del proceso.

En una síntesis habitual, se impregna 1g de material mesoporoso de sílice SBA-15 sin calcinar con 0.08 ml de H₂SO₄ en 4 ml de H₂O bidestilada. Tras agitación vigorosa durante 30 minutos, la mezcla se somete a tratamiento térmico a 100 °C durante 12 horas y seguidamente a 160 °C durante otras 12 horas. Así se obtiene un polvo negruzco que se piroliza a 900 °C en sistema cerrado bajo corriente de argón para obtener un composite de sílice y carbón. Finalmente la plantilla de sílice se disuelve por lavado con una disolución de NaOH 1M (50 %vol. EtOH– 50 %vol. H₂O) a 100 °C durante 1 hora.

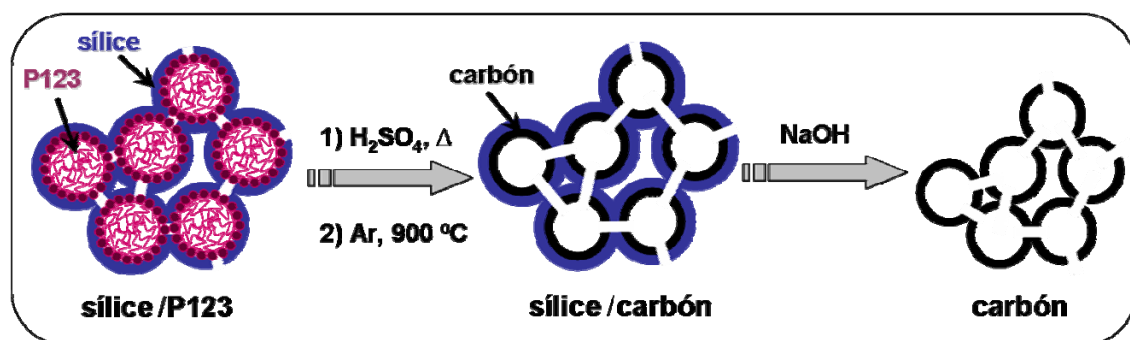


Figura II.2.2. Esquema del proceso de síntesis de materiales mesoporosos ordenados de carbono mediante nanomoldeo con plantillas de materiales mesoporosos ordenados de sílice por síntesis directa (*direct synthesis, DS*). Adaptada de referencia [417].

En este procedimiento, el ácido sulfúrico se infiltra no sólo en los mesoporos sino también en los microporos del material SB A-15 sin calcinar, el cual contiene el surfactante en el interior de los poros. De esta manera se favorece la carbonización de las moléculas de surfactante P123 que se entrecruzan entre micelas para formar los canales de microporos [418] dando lugar a tubos de carbono interconectados. La muestra así obtenida se ha denominado **CMK-3-DS**.

II.2.2.1.3.- Síntesis en una etapa

Con objeto de desarrollar procedimientos sintéticos que simplifiquen el proceso tradicional de obtención de carbono mesoporoso ordenado basado en la impregnación en varias etapas, algunos autores han propuesto utilizar la combinación de surfactante y sacarosa como agente director de estructura en la síntesis de sílice mesoporosa a la vez que como fuente de carbono [419]. Esta estrategia se muestra de manera esquemática en la Figura II.2.3.

En este método, la polimerización sol-gel de la sílice en presencia del surfactante Pluronic P123 y sacarosa da lugar a un composite de sílice/P123/sacarosa que posteriormente se trata con ácido sulfúrico y se carboniza para transformarlo en un composite de sílice/carbón. Por último, la eliminación de la plantilla de sílice da lugar a un material mesoporoso ordenado de carbono. Una de las etapas clave del proceso consiste en el entrecruzamiento parcial del copolímero de bloque P123 y la sacarosa durante el pre-tratamiento con ácido. Debido a la actividad catalítica y deshidratante del

ácido sulfúrico, una gran parte de los átomos de oxígeno de las moléculas de surfactante y sacarosa forman agua por reacción de eliminación.

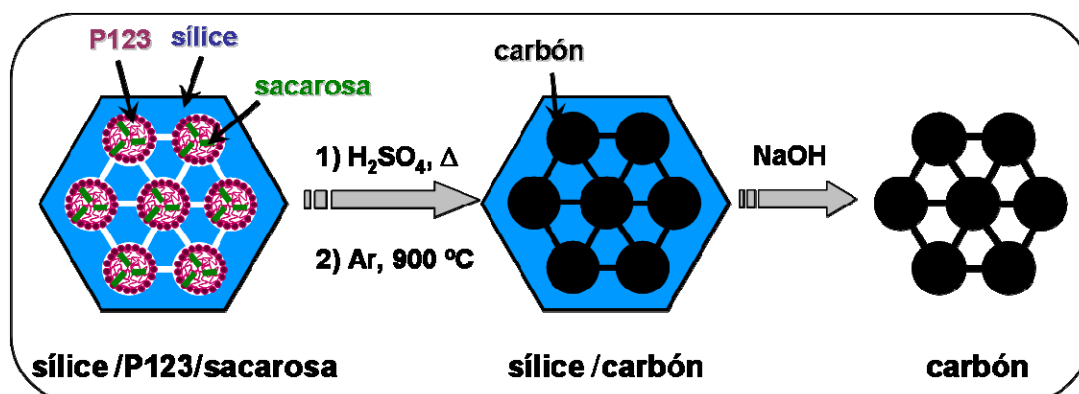


Figura II.2.3. Síntesis de carbón mesoporoso ordenado en una etapa (*one-pot synthesis, OP*) mediante nanomoldeo con plantillas “duras”. Adaptado de la referencia [419].

En una síntesis habitual, se disuelven 4 g de copolímero de bloque Pluronic P123 (Aldrich) y 1 g de sacarosa en 160 ml de una disolución de HCl 2M en agitación vigorosa a 40°C . Transcurridas 3 horas, se añaden 9.2 ml de tetraetilortosilicato (TEOS, Aldrich 98 %) obteniéndose una mezcla de composición molar $1 \text{ SiO}_2: 212 \text{ H}_2\text{O}: 7.7 \text{ HCl}: 0.017 \text{ P123}: 0.071 \text{ C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. El gel obtenido se envejece en recipientes de Teflon[®] herméticamente cerrados mediante tratamiento a 100°C durante 24 horas en condiciones estáticas. El precipitado obtenido se filtra, se lava con agua bidestilada y se seca a temperatura ambiente dando lugar a un composite de sílice/P123/sacarosa. En una segunda etapa, se mezcla 1 g de composite con una disolución de 1 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , Aldrich 98 %) en 10 ml de H_2O bidestilada. Tras agitación durante 12 horas a temperatura ambiente, la mezcla se trata a 160°C durante 6 horas. A continuación, el material negruzco resultante se somete a un tratamiento térmico a 850°C durante 2 h en corriente de argón para así carbonizar por pirólisis el P123 y la sacarosa. Finalmente, la sílice se elimina por disolución con NaOH 1M (50 %vol. EtOH– 50 %vol. H_2O) a 100°C . El material mesoporoso ordenado de carbón así obtenido se denomina **SBA-15-OP**.

II.2.2.2.- Síntesis de CMK-1 a partir de MCM-48

De manera análoga al procedimiento descrito para la síntesis del material CMK-3, la síntesis del material mesoporoso ordenado de carbono CMK-1 se ha llevado a cabo a partir del material mesoporoso ordenado de sílice MCM-48 empleado como plantilla

mediante el método de impregnación incipiente utilizando sacarosa como fuente de carbono.

El procedimiento experimental [263] consiste en la impregnación de 1 g de MCM-48 con una disolución de 1.25 g de sacarosa, 0.14 g de H_2SO_4 y 6 g de H_2O . La mezcla resultante se somete a tratamiento térmico a 100 °C durante 6 horas para eliminar el agua y a continuación a 160 °C durante otras 6 horas para completar la polimerización de la sacarosa. A continuación, se impregna de nuevo el material resultante con una disolución de 0.75 g de sacarosa, 0.08 g de H_2SO_4 y 6.0 g de H_2O y se somete nuevamente al tratamiento térmico en dos etapas previamente descrito. La muestra se carboniza por pirólisis a 900 °C en corriente de argón. Finalmente, se disuelve la plantilla de sílice con una disolución de NaOH 1M (50 %vol. EtOH- 50 % vol. H_2O) a 100 °C, obteniendo así el material denominado **CMK-1**.

II.2.2.3.- Síntesis de C-ORNL-1

En comparación con el método de nanomoldeo con plantillas “duras” para la síntesis de materiales de carbono descrito, en el que la mesoestructura y el orden de la estructura porosa vienen determinados por la plantilla de sílice empleada, el método de nanomoldeo con plantillas “blandas” se basa en el autoensamblaje cooperativo de surfactantes de tipo copolímero de bloque con precursores poliméricos de carbono tales como resinas fenólicas [313]. Así pues, de manera análoga al mecanismo de síntesis de los materiales mesoporosos ordenados de sílice, el autoensamblaje de las moléculas de surfactante dirige la polimerización y la organización del precursor de carbón, conduciendo a la formación de materiales mesoestructurados de tipo surfactante-polímero. La existencia de enlace de hidrógeno entre el copolímero de bloque y la resina fenólica constituye la fuerza motriz para la formación de la mesoestructura ordenada [314]. La aproximación sintética descrita se muestra de manera esquemática en la Figura II.2.4 y la Figura II.2.5.

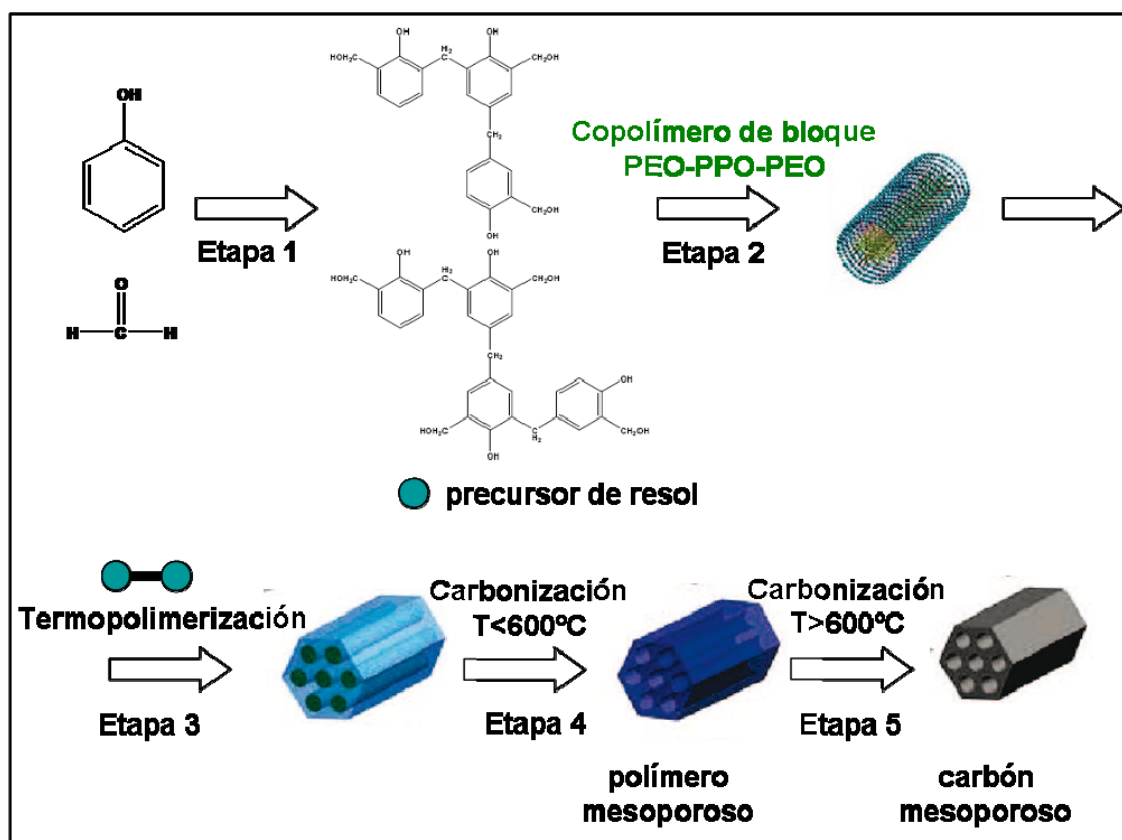


Figura II.2.4. Nanomoldeo con plantillas "blandas" para la síntesis de carbón mesoporoso ordenado empleando resinas fenólicas de tipo resol como fuente de carbono y copolímeros de bloque como agentes directores de estructura. Adaptado de la referencia [312].

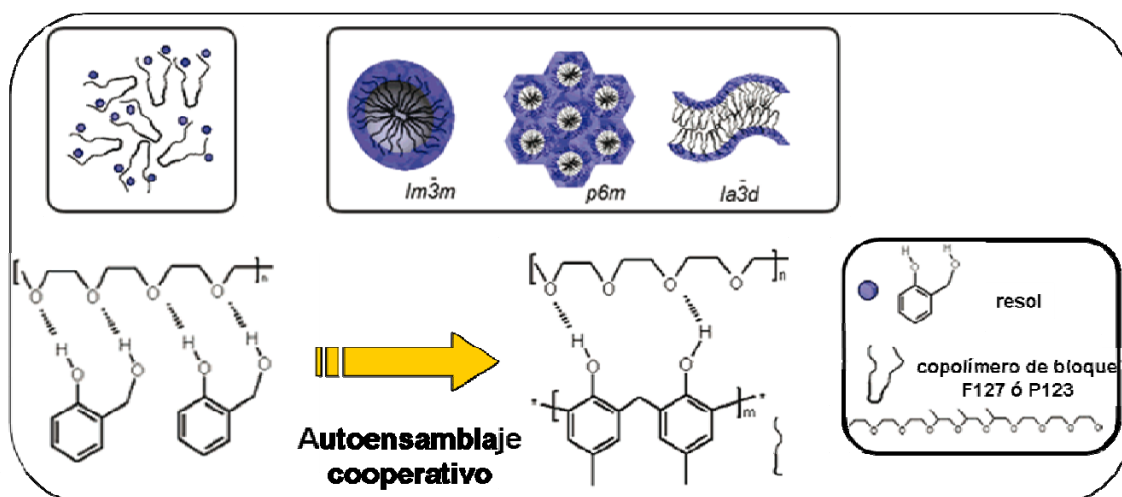


Figura II.2.5. Esquema de la interacción entre resina fenólica y surfactante. Adaptado de la referencia [315].

Diversos estudios demuestran que mediante esta estrategia es posible sintetizar materiales mesoporosos ordenados de carbono altamente ordenados en un amplio rango de composiciones 1.1 resorcinol: 1.1 F127: 0.48 formaldehído: (3.55-8.2 etanol): (5.1-1.67 agua): (0.16-0.66 HCl). En una síntesis habitual se disuelven 1.1 g de resorcinol (Aldrich) y 1.1 g de copolímero de bloque Pluronic F127 ($\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$, $M_w = 12600$, Aldrich) en 4.5 mL de EtOH y 4.5 mL de una disolución de HCl 3M. A continuación, se añaden 1.3 g de formaldehído (CH_2O , Aldrich 37 %) a esta disolución. Tras agitación continuada a temperatura ambiente durante tan sólo 11 minutos, la mezcla inicialmente transparente se vuelve turbia indicando la formación de RF-F127 y dando lugar a una separación de fases. La mezcla se agita durante 40 minutos y a continuación se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos, obteniendo en el fondo del tubo una fase de color blanco rica en polímero [420]. El gel se extiende sobre una superficie y se deja secar a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación se lleva a cabo el curado del polímero mediante tratamiento térmico a 80 °C durante 24 horas seguido de posterior tratamiento a 120 °C durante otras 24 horas. Finalmente, el material denominado **C-ORNL-1** se obtiene tras la carbonización en atmósfera de argón a 400 °C durante 2 h con una rampa de calentamiento de 1 °C/min para eliminar el copolímero de bloque, seguido de tratamiento a 850 °C durante 3 h con una rampa de calentamiento de 5 °C/min para carbonizar la resina. La Figura II.2.6 muestra imágenes de los materiales obtenidos en las distintas etapas del proceso.

Es interesante comentar que el color rojizo de los materiales de la Figura II.2.6 antes de la carbonización se debe a la existencia de conjugación en los anillos aromáticos de la resina fenólica, que actúan como grupos cromóforos que absorben en la zona visible del espectro electromagnético.

Los materiales de carbón sintetizados se han caracterizado por diversas técnicas recogidas en el Apéndice III.2.

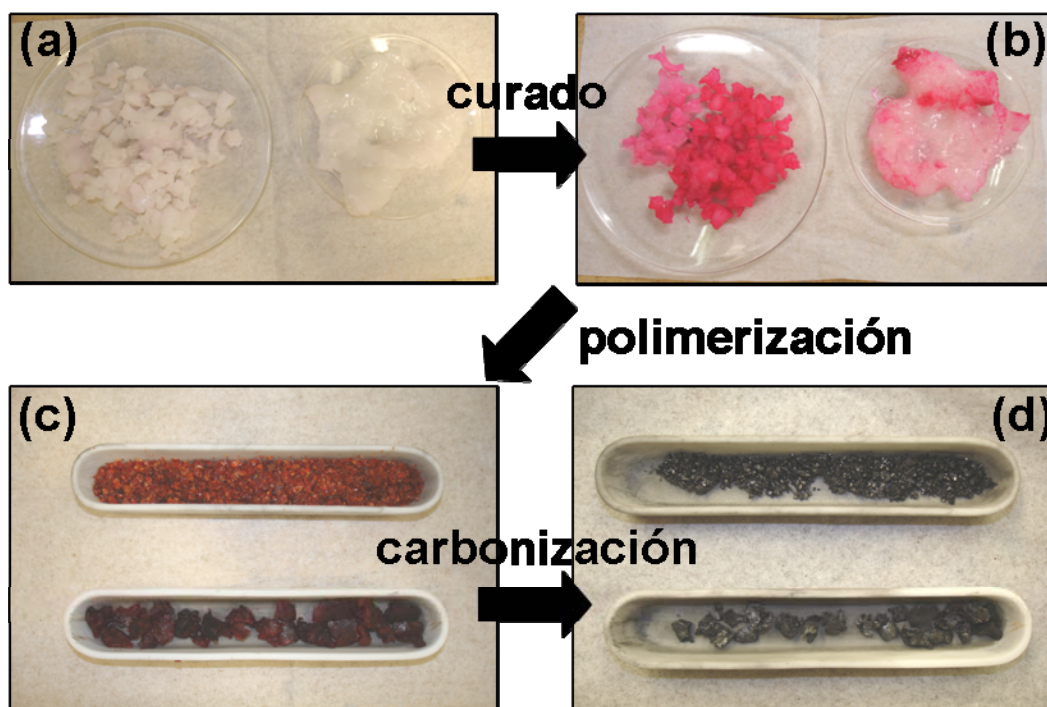
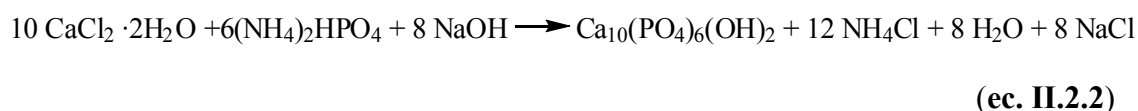


Figura II.2.6. Materiales C-ORNL-1 (a) tras la polimerización, (b) tras el secado a temperatura ambiente, (c) tras el tratamiento térmico de curado y (d) tras la carbonización.

II.2.3.- SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA A PARTIR DE MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS DE CARBÓN

La síntesis de hidroxiapatita se ha llevado a cabo por el método de precipitación en vía húmeda en combinación con el proceso de nanomoldeo [411]. Dada la estabilidad termodinámica de la hidroxiapatita, es posible sintetizarla mediante precipitación directa a partir de sales que contengan iones calcio y fosfato, a valores de pH por encima de 7.4 [367]. Para que la reacción sea cuantitativa los reactivos deben ser sales de Ca^{2+} y PO_4^{3-} con iones que no puedan incorporarse o presenten una incorporación limitada a la estructura apatita tales como el Cl^- y NH_4^+ . En una síntesis habitual, se disuelven 1.58 g de hidrogenofosfato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Merck) en 120 ml de agua bidestilada y se incorporan 0.36 g de material poroso de carbón. A esta suspensión se adicionan gota a gota 2.94 g cloruro cálcico ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Aldrich) disueltos en 60 ml de agua bidestilada con un caudal de *ca.* 15 ml/min y con agitación constante, de manera que se cumpla la relación estequiométrica $\text{Ca/P} = 1.67$. La reacción que tiene lugar es:



A continuación, se ajusta el pH de la reacción a 10-11 con una disolución de NaOH 2M observándose la formación de un precipitado blanco. Durante el método de precipitación es importante mantener el pH por encima de 9 para evitar la formación de hidroxiapatita deficiente en calcio que tras el sinterizado se descompone fácilmente formando fosfatos tricálcicos. La disolución se mantiene bajo reflujo a 120 °C durante 24 horas. A continuación, el precipitado se envejece a temperatura ambiente durante 12 horas. Finalmente, la suspensión se filtra y se lava con abundante agua destilada y el precipitado grisáceo se seca en estufa a 60 °C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el material se calcina en una mufla a 600 °C en atmósfera de aire durante 8 horas para eliminar la plantilla de carbón. Finalmente se obtiene un polvo blanco de fosfato de calcio. La Figura II.2.7 muestra un esquema de las etapas involucradas en la síntesis descrita.

Los carbones mesoporosos ordenados empleados como plantilla han sido, por un lado, los denominados CMK-3 y CMK-1 obtenidos por el proceso de nanomoldeo a partir de materiales mesoporosos ordenados de sílice SBA-15 y MCM-48, respectivamente. Por otro lado se ha utilizado como plantilla el denominado C-ORNL-1, obtenido por el proceso de nanomoldeo mediante el autoensamblaje cooperativo de resinas fenólicas y copolímeros de bloque (véanse apartados II.2.1 y II.2.2). En función del carbón empleado en la síntesis, los fosfatos de calcio obtenidos mediante nanomoldeo se han denominado **HA-CMK-3**, **HA-CMK-1** y **HA-C-ORNL-1**, respectivamente.

Para entender el papel de la plantilla de carbono en la síntesis de hidroxiapatita por nanomoldeo, se ha sintetizado hidroxiapatita siguiendo el método de precipitación anteriormente descrito en ausencia de plantilla de carbón, obteniéndose la muestra **HA**. Por otro lado, se ha sintetizado hidroxiapatita empleado como material de control un carbón activado comercial microporoso sin mesoestructura ordenada, dando lugar a la muestra **HA-C**.

Los materiales de hidroxiapatita sintetizados se han caracterizado por diversas técnicas recogidas en el Apéndice III.2.

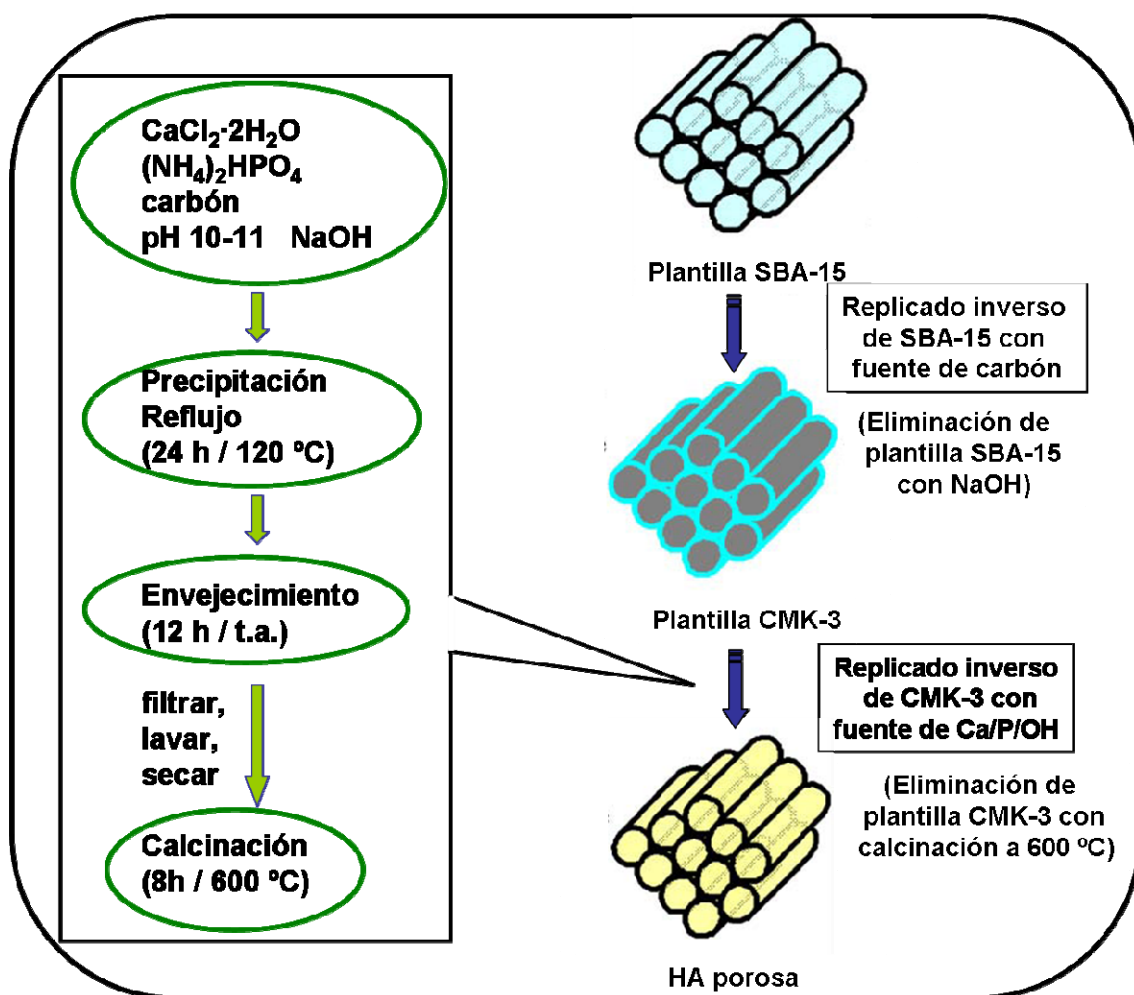


Figura II.2.7. Esquema de la ruta de síntesis propuesta para la obtención de hidroxipatita mediante nanomoldeo con plantillas de carbón mesoporoso CMK-3.

II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1.- MATERIALES ORDENADOS DE CARBÓN

Con el objetivo de determinar la estructura de los materiales sintetizados, se han registrado los diagramas de difracción de rayos X a bajo ángulo (SA-XRD). En la Figura II.3.1 se muestran los diagramas SA-XRD del material CMK-3 en las distintas etapas de la síntesis mediante nanomoldeo a partir de sílice mesoporosa ordenada SBA-15.

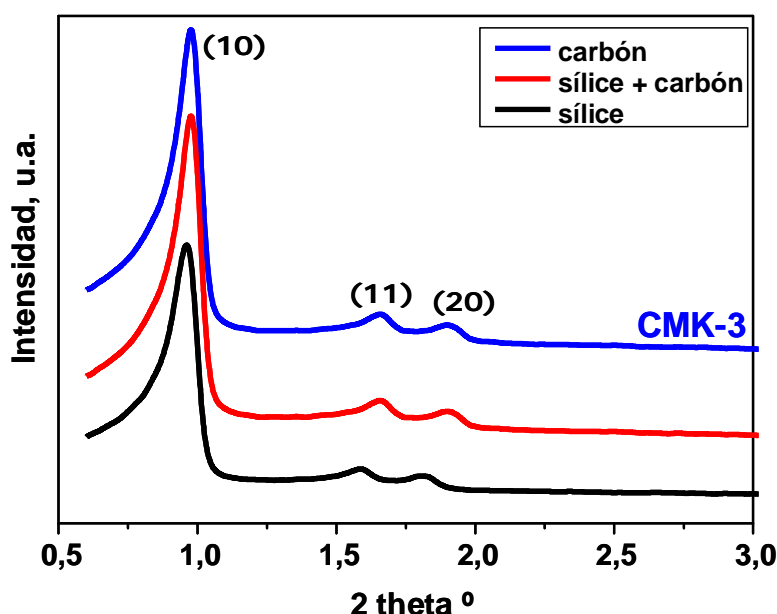


Figura II.3.1. SA-XRD del material de carbono CMK-3 en las distintas etapas del proceso de nanomoldeo mediante la impregnación de plantillas de sílice SBA-15 con sacarosa.

Estos diagramas de difracción no son producto de la cristalinidad de la sílice o del carbón, ya que los materiales estudiados están constituidos por sílice o carbón amorfo, es decir, son amorfos a escala atómica, sino que son producto del orden de motivos que son mesoporos en el caso de la sílice o tubos en el caso del carbón. Dado que las distancias entre motivos adyacentes son mayores que la escala atómica de la sílice o del carbón, los diagramas se registran a bajo ángulo. En efecto, según la ley de Bragg de la difracción, $n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$, a mayor ángulo, menor espaciado entre líneas consecutivas de motivos ordenados en una dirección dada.

La estructura del material de sílice SBA-15 consiste en un orden 2D-hexagonal de poros cilíndricos con un tamaño de *ca.* 9 nm, paredes gruesas de *ca.* 2 nm y microporos que interconectan mesoporos adyacentes [418,421]. Tal y como muestra la Figura II.3.1, este material de partida presenta máximos de difracción bien resueltos que corresponden

a las reflexiones (10), (11) y (20) características de una simetría 2D-hexagonal con grupo planar $p6mm$. El material de carbón CMK-3 obtenido como réplica inversa del material SBA-15, presenta un patrón de difracción similar, lo cual indica que la simetría y el orden se conservan tras el proceso de nanomoldeo. Tanto en el caso del material SBA-15 como en CMK-3, el orden hexagonal presente en dos dimensiones se deriva del mecanismo de síntesis, empleando surfactantes como agentes directores de estructura en el caso de la sílice o empleando la sílice mesoporosa como plantilla en el caso del carbón. Los tubos de carbón principales en el material CMK-3 están interconectados a través de pequeños tubos formados por el carbón que ha rellenado los microporos que interconectan los canales mesoporosos en el material SBA-15 [415]. Los valores del parámetro de celda, a_0 , calculado a partir de la posición de la reflexión (10) se recogen en la Tabla II.3.1, donde se puede observar una disminución en este parámetro al pasar de sílice (11.3 nm) a carbón (9.7 nm) debido a la contracción estructural tras la carbonización.

La Figura II.3.2 muestra los difractogramas a bajo ángulo del material de sílice MCM-48 y del material de carbón CMK-1 obtenido tras la impregnación de la plantilla de sílice con sacarosa. El MCM-48 tiene una estructura tridimensional de simetría cúbica bicontinua con un grupo espacial $Ia-3d$, constituida por dos enantiómeros no interconectados entre sí que dan lugar a poros cilíndricos en tres dimensiones de *ca.* 3 nm de diámetro [299,422,423,424,425]. En el diagrama de SA-XRD se pueden observar las reflexiones (211), (220), (420) y (332), de acuerdo con esta simetría cúbica bicontinua. Los valores del parámetro de celda, a_0 , calculado a partir de la posición de la reflexión (211) se recogen en la Tabla II.3.1. En cuanto al CMK-1, el diagrama de SA-XRD muestra dos máximos de baja intensidad que se asocian a las reflexiones (110) y (210) características de una estructura cúbica centrada que, según datos bibliográficos, pertenecería al grupo espacial $I4_132$. En efecto, a partir de la posición de los máximos de difracción de la Figura II.3.2, es posible calcular los espaciados interplanares experimentales, $d = 4.95$ nm y $d = 2.85$ nm, los cuales están en buen acuerdo con los espaciados teóricos correspondientes a una estructura de simetría cúbica. Así, asumiendo una fase cúbica, se han calculado los valores del parámetro de celda, a_0 , a partir de la posición de la reflexión (110) (Tabla II.3.1). La estructura bicontinua del material MCM-48 con dos sistemas porosos interpenetrados de canales no interconectados da lugar, tras la impregnación y la eliminación de la plantilla, a un

material de carbono CMK-1 tubular [263]. En el proceso, la estructura de sílice original sufre una transformación sistemática. En general e independientemente del proceso de carbonización, suele producirse una contracción de la estructura al someter al MCM-48 a elevadas temperaturas.

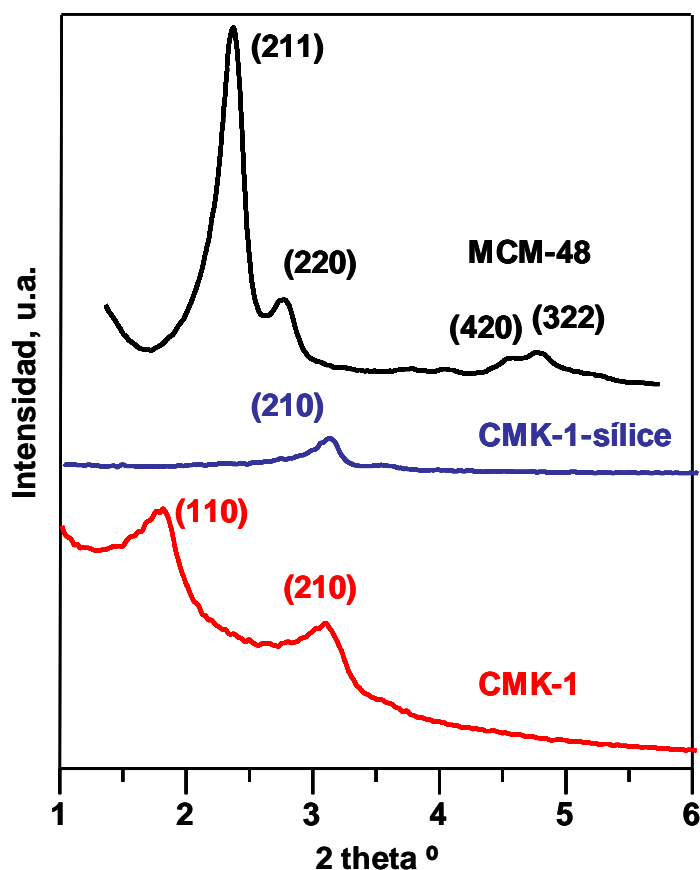


Figura II.3.2. SA-XRD del material mesoporoso ordenado de sílice MCM-48, del material tras la carbonización del precursor (CMK-1-sílice) y del material CMK-1 tras la eliminación de la plantilla de sílice.

La Figura II.3.3 muestra el diagrama de SA-XRD del material mesoporoso ordenado de carbono C-ORNL-1 obtenido a partir del autoensamblaje cooperativo de resorcinol y Pluronic F127 en medio ácido. En este caso sólo se observa el máximo de difracción más intenso correspondiente a la reflexión (10) . A partir de observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), que se muestran a continuación, se considera que tiene una simetría correspondiente al grupo planar $p6mm$. El valor del parámetro de celda, a_0 , calculado a partir de la posición de la reflexión (10) se recoge en la Tabla II.3.1.

Por otro lado, en la Figura II.3.4 se muestran los diagramas de XRD por encima de 10° (2θ) de los carbones sintetizados. En todos los casos se observa un máximo de difracción muy ancho en el rango 10° – 30° que se atribuye a la reflexión (002) a 0.39 nm, así como un máximo de difracción ancho entre 40° y 50° que se indexa a la

reflexión (004) a 0.21 nm. Estos máximos de difracción son típicos de carbón turbostático (también llamado grafito desordenado) [426] indicando que sólo hay unas pocas láminas de grafeno paralelas [427] y que, por tanto, la pared de carbono de los materiales sintetizados es de naturaleza amorfa, compuesta por láminas de carbono orientadas de manera aleatoria [428].

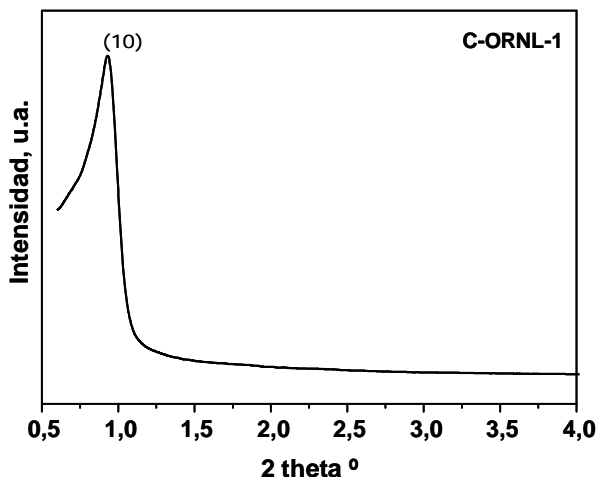


Figura II.3.3. SA-XRD del material C-ORNL-1 obtenido mediante el autoensamblaje cooperativo de resorcinol y Pluronic F127 en medio ácido.

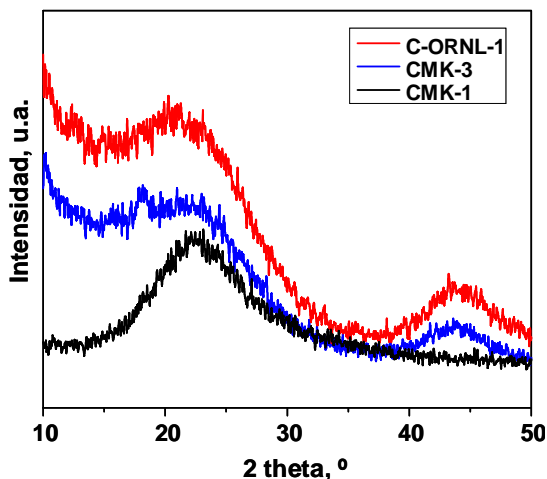


Figura II.3.4. Diagramas de XRD de alto ángulo de los materiales mesoporosos ordenados de carbono sintetizados CMK-3, CMK-1 y C-ORNL-1.

La Figura II.3.5 (a,b) muestra las imágenes de TEM tomadas con el haz de electrones paralelo a los canales y las correspondientes transformadas de Fourier para los materiales mesoporosos ordenados de carbono CMK-3 y C-ORNL-1. Se puede observar el orden 2D-hexagonal típico del SBA-15, siendo imágenes idénticas a la de dicha estructura. Sin embargo, en este caso los contrastes son distintos debido a que son réplicas y los canales están llenos de carbono, resultando en blanco las zonas huecas y en negro los cilindros de carbono. La Figura II.3.5 (c) muestra la imagen TEM del carbono mesoporoso ordenado CMK-1 y su correspondiente transformada de Fourier la cual muestra máximos de difracción muy débiles. Se observan espaciados interplanares a 4.3 nm que corresponden con la reflexión (110) de una fase cúbica determinada por XRD.

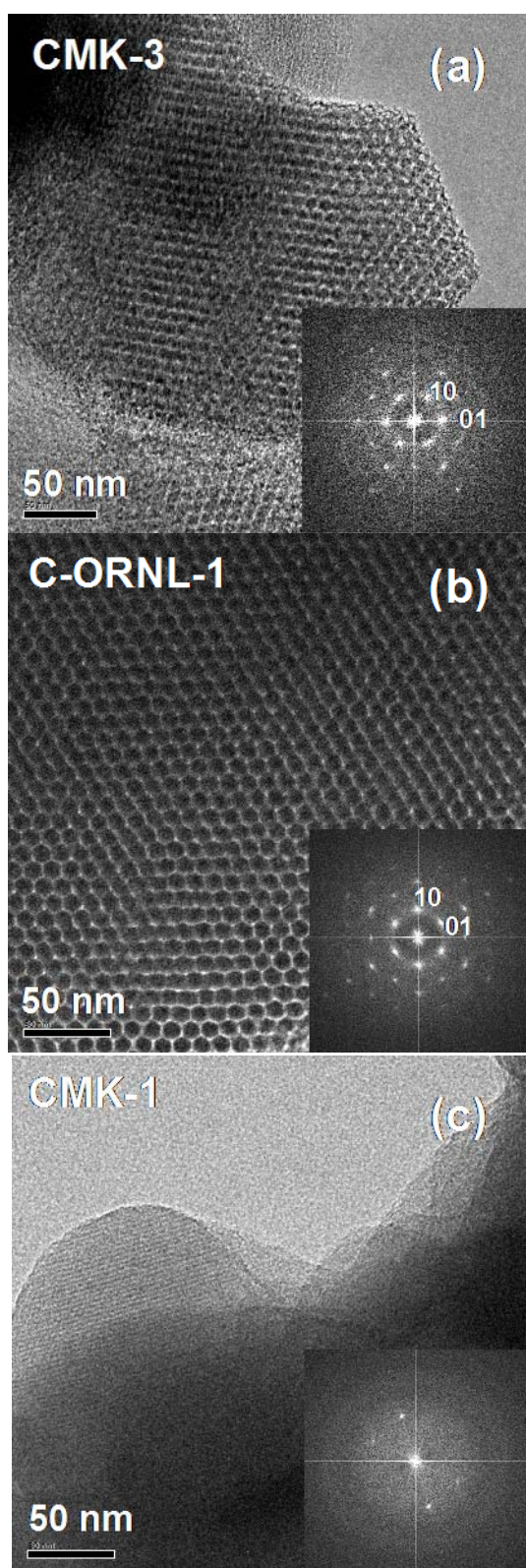


Figura II.3.5. Imágenes de TEM y diagramas de difracción de electrones de los materiales mesoporosos ordenados de carbón (a) CMK-3, (b) C-ORNL-1 y (c) CMK-1.

La Figura II.3.6 muestra las isotermas de adsorción/desorción de N_2 y la distribución de tamaño de poro (*pore size distribution, PSD*) de los materiales de sílice y de carbón sintetizados.

Todos los materiales presentan isotermas de tipo IV de acuerdo con la clasificación de la IUPAC [429]. Los materiales SBA-15, CMK-3 y C-ORNL-1 presentan ciclos de histéresis de tipo H1, de acuerdo con la presencia de poros cilíndricos o de cuello de tintero abiertos en ambos extremos. De manera general, no se observan etapas de condensación capilar agudas en intervalos estrechos de P/P_0 , lo cual concuerda con las anchas distribuciones de tamaño de poro observadas. Por un lado, el SBA-15 presenta el mayor tamaño de poro en comparación con los demás materiales sintetizados, así como el C-ORNL-1 presenta el mayor tamaño de poro frente al resto de los carbones sintetizados.

La estructura porosa de CMK-1 y CMK-3 viene determinada por los parámetros estructurales de las plantillas de sílice empleadas tales como espesor de la pared de poro, tamaño de poro y orden estructural.

Lo habitual es que, por motivos geométricos, el diámetro de poro del CMK-3 se relacione con el espesor de la pared de sílice entre poros adyacentes del SBA-15, ya que el carbón se obtiene como réplica inversa. Sin embargo, en el caso del CMK-1, la síntesis no sigue un proceso directo de replicado sino que implica un cambio de simetría, por lo que el diámetro de poro del carbón puede ser muy distinto del espesor de la pared de sílice del MCM-48. Por el contrario, el espesor de la pared del carbón C-ORNL-1 está relacionado con el tamaño de los dominios del resorcinol y con la relación de volúmenes entre dicha resina y el surfactante F127 empleado como agente director de estructura. En la Figura II.3.7 se explica de manera esquemática la relación del espesor de la pared y tamaño de poro de la sílice con el tamaño de poro y el espesor de la pared del carbón obtenido como réplica inversa.

Debido al proceso de nanomoldeo, el espesor de pared de los carbones sintetizados corresponde al diámetro de los tubos de carbono interconectados y no es, por lo tanto, un espesor de pared tal y como ocurre en las sílices mesoporosas o en carbones tipo CMK-5, estos últimos constituidos por tubos huecos de carbón [430]. Los valores de diámetro de poro calculados a partir de los datos de adsorción de N_2 están en todos los casos de acuerdo con los valores bibliográficos, aunque es preciso mencionar que el método empleado, BJH con corrección KJS, presupone una geometría cilíndrica de los poros. En el caso de los carbones mesoporosos, los poros son el espacio que antes ocupaban las paredes de sílice o, lo que es lo mismo, los huecos que existen entre los tubos de carbón interconectados. Por ello, el método BJH, aunque comúnmente aceptado para el cálculo del tamaño de poro en carbones mesoporosos, pudiera no ser estrictamente riguroso. Así, de manera alternativa, algunos autores han aplicado el modelo de la teoría del funcional de la densidad (*density functional theory, DFT*) [431] en el caso de materiales de simetría cúbica CMK-1 asumiendo poros en forma de rendija (*slit-like*) [433].

La Tabla II.3.1 representa los parámetros texturales y estructurales de las plantillas de sílice y las réplicas de carbón sintetizadas.

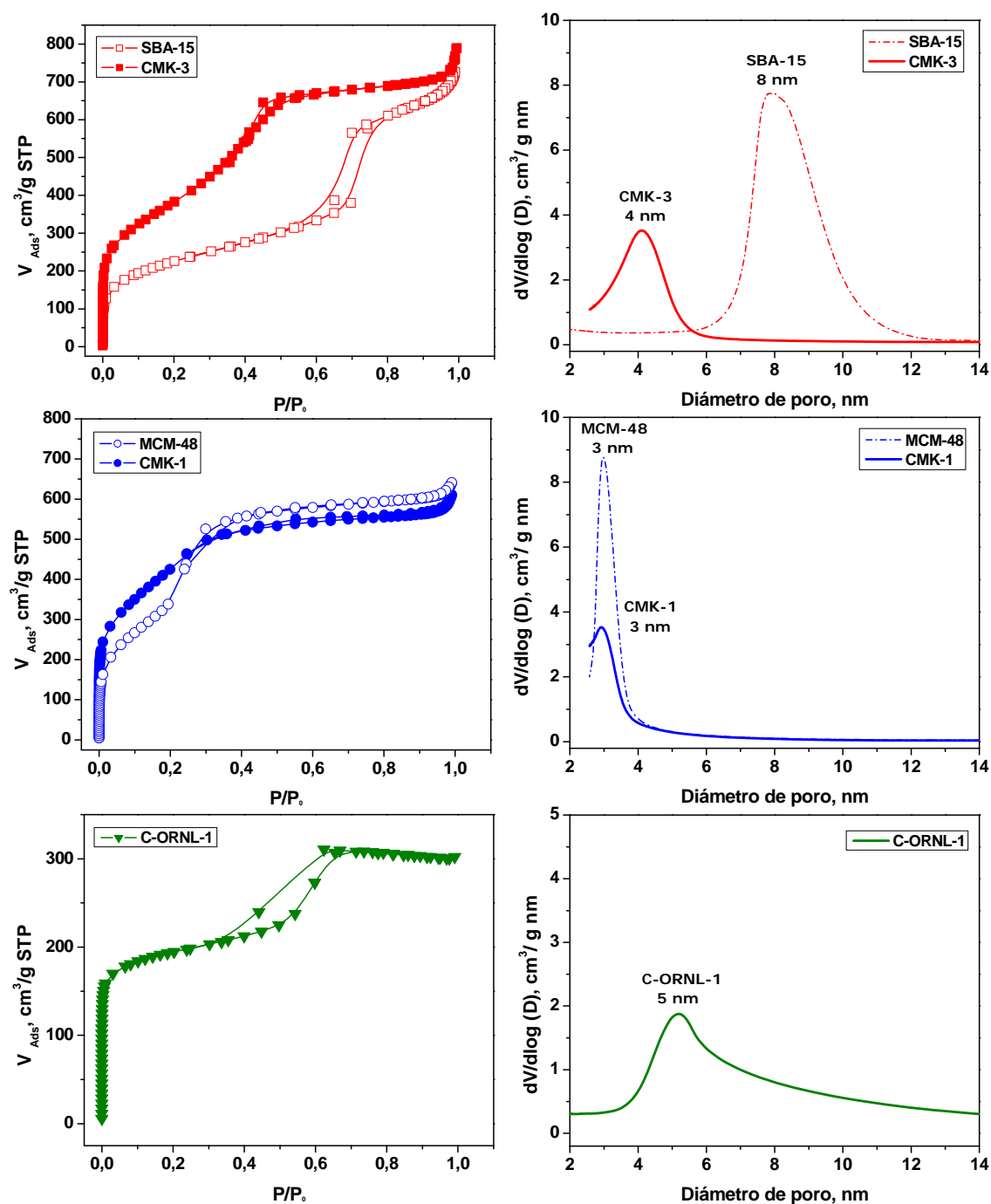


Figura II.3.6. Isothermas de adsorción/desorción de N_2 (izquierda) y distribución de tamaño de poro (derecha) de los materiales de carbón y sus plantillas de sílice correspondientes. La síntesis del material C-ORNL-1 no utiliza plantilla de sílice.

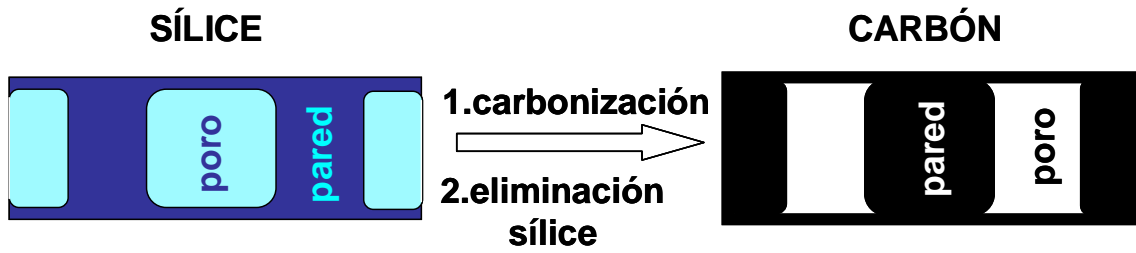


Figura II.3.7. Relación entre el espesor de la pared de sílice del SBA-15 y el tamaño de poro del carbón CMK-3 obtenido por nanomoldeo. Adaptada de la referencia [432].

Tabla II.3.1. Parámetros texturales y estructurales de los materiales de sílice y de los materiales de carbón obtenidos

	S_{BET}^a , m^2/g	V_{T}^b , cm^3/g	$V_{\mu\text{p}}^c$, nm	a_0^d , nm	D_{p}^e , BJHads, nm	t_{w}^f , nm	D_{p}^g , TEM, nm
SBA-15	800	1.10	0.04	11.3	8.0	3.3	—
CMK-3	1300	1.05	0.10	10.9	4.3	7.0	3.9
MCM-48	1100	0.99	—	8.2	3.0	1.2	—
CMK-1	1640	0.95	0.02	7.4	3.0	4.4	3.0
C-ORNL-1	725	0.63	0.20	11.4	5.4	8.0	3.4

^a superficie específica B.E.T.

^b volumen total de poro

^c volumen de microporo (t -plot)

^d parámetro de red

^e diámetro de poro calculado a partir de adsorción de N_2 (BJH adsorción)

^f espesor de la pared

^g diámetro de poro calculado a partir de imágenes de TEM

El parámetro de red (a_0) se ha calculado a partir de las fórmulas $a_0 = 2d_{10}/\sqrt{3}$ para SBA-15, CMK-3 y C-ORNL-1, $a_0 = d_{211}/\sqrt{6}$ para MCM-48 y $a_0 = d_{110}/\sqrt{2}$ para CMK-1 [301,433], de acuerdo con su simetría característica. El espesor de la pared de poro (t_{w}) se ha calculado mediante las fórmulas $t_{\text{w}} = a_0 - D_{\text{p}}$ [434] para el material SBA-15 de simetría $p6mm$ y $t_{\text{w}} = a_0/3.0919 - D_{\text{p}}/2$ [435] para el material MCM-48 con simetría $1a-3d$, donde a_0 representa el parámetro de red y D_{p} el diámetro de poro obtenido por adsorción de nitrógeno mediante el método BJH con corrección KJS. Por otro lado, el espesor de pared y el diámetro de poro para los carbones se ha determinado a partir de las imágenes de TEM tal y como se muestra de manera esquemática en la Figura II.3.8.

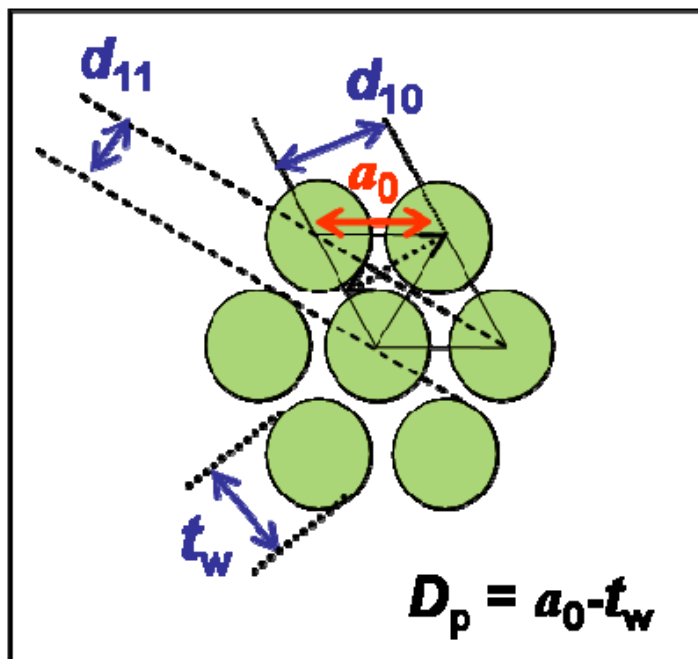


Figura II.3.8. Esquema representando el método de cálculo de D_p para los carbones sintetizados en el sistema 2D-hexagonal.

Se observan relaciones directas entre el espesor de la pared de sílice y el diámetro de poro del carbón obtenido. Así, el SBA-15, con mayor espesor de pared de sílice que el MCM-48, da lugar al carbón CMK-3 de mayor diámetro de poro que el CMK-1 (Figura II.3.6). De hecho, el diámetro de poro del CMK-3 es próximo al espesor de la pared de sílice SBA-15 y el diámetro de poro del CMK-1 es prácticamente el doble del espesor de la pared de sílice MCM-48. Cabe mencionar que los parámetros texturales de los carbones también dependen del grado de llenado de los poros de la plantilla de sílice con el precursor orgánico [436]. Así, partiendo de la misma sílice plantilla, variaciones en la proporción sacarosa/sílice pueden dar lugar a carbones con distinto diámetro de poro. En los experimentos aquí presentados la proporción sacarosa/sílice se ha mantenido constante e igual a 1.25.

Los valores de superficie específica y volumen de poro están en buen acuerdo con la bibliografía. Por otro lado, los valores de diámetro de poro calculados a partir de las imágenes de TEM están en buen acuerdo con los obtenidos a partir de medidas de adsorción de N_2 , aunque existen diferencias debido al modelo matemático empleado, tal y como ha sido comentado anteriormente. Se observa que el diámetro de poro del SBA-15 (8.0 nm) calculado a partir de medidas de adsorción de N_2 es equivalente al diámetro de los tubos de carbón (7.0 nm) calculado directamente a partir de imágenes de TEM, lo cual demuestra que el CMK-3 es una réplica inversa del material de sílice SBA-15. Por

otro lado, el espesor de la pared del SBA-15 (3.3 nm) es del orden del diámetro de poro del CMK-3 (4.3 nm) calculado a partir de medidas de adsorción de N₂ y está de acuerdo con la distancia entre cilindros medida en las imágenes de TEM (3.9 nm), ya que el diámetro de un cilindro que se pueda colocar en el espacio vacío entre los tubos de carbono cilíndricos ordenados de manera hexagonal con sus ejes centrales separados por 10.9 nm y una distancia entre superficies de 3.9 nm es próximo a 4.3 nm [415].

Los carbones mesoporosos ordenados preparados a partir de plantillas de sílice poseen generalmente una fracción de microporos en las paredes como consecuencia de la carbonización del polímero empleado como fuente de carbono. De hecho, se postula que los microporos presentes en el material CMK-3 se originan debido a la polimerización incompleta de las moléculas de sacarosa en el interior de los mesoporos de la plantilla, debido a la ruptura de enlaces C-C durante la pirólisis, o bien debido a cambios estructurales que tienen lugar durante la disolución de la plantilla de sílice [437]. El análisis por el método *t* (*t*-plot) [438], muestra que los materiales poseen microporosidad (ver Tabla II.3.1), en buen acuerdo con la bibliografía [439]. Sin embargo, la estrategia más adecuada para estudiar la microporosidad de los materiales se basa en la comparación de la adsorción de diferentes adsorbatos, tal y como se describe más adelante en el apartado II.3.3.2.

La síntesis de materiales mesoporosos de carbono empleando plantillas de sílice mesoporosa ordenada mediante nanomoldeo es un proceso tedioso ya que involucra numerosas etapas sucesivas. Con objeto de disminuir el número de etapas, algunos autores han sugerido modificaciones del proceso de síntesis centrados en la etapa de impregnación con el precursor. Así pues, en esta tesis se han empleado las estrategias de síntesis directa (DS) y síntesis en una etapa (OP) y se han comparado con el proceso de impregnación directa con sacarosa (ver la descripción experimental en sección II.2.2.1). La Figura II.3.9 muestra los diagramas de SA-XRD de los materiales mesoporosos ordenados de carbón obtenidos empleando el método síntesis en una sola etapa (CMK-3-OP), así como los materiales obtenidos en los distintos pasos del proceso de nanomoldeo. Los diagramas de SA-XRD del material obtenido mediante síntesis directa (CMK-3-DS) son cualitativamente análogos a los correspondientes al carbón obtenido por impregnación con sacarosa (Figura II.3.1).

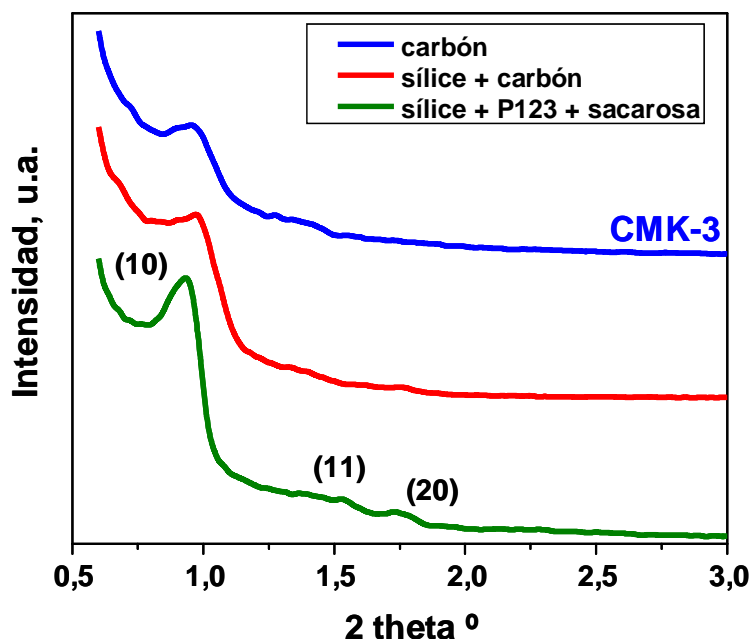


Figura II.3.9. SA-XRD del material CMK-3 en los distintos pasos del proceso de nanomoldeo con plantillas de sílice SBA-15 mediante síntesis en una etapa.

La Figura II.3.10 muestra las isotermas de adsorción/desorción de N_2 y la distribución de tamaño de poro de los materiales CMK-3 obtenidos por impregnación con sacarosa (CMK-3), síntesis directa (CMK-3-DS) y síntesis en una etapa (CMK-3-OP), así como su comparación con el SBA-15 plantilla. En el caso de la síntesis directa, se muestran las isotermas de adsorción/desorción de N_2 antes (CMK-3-DS sílice) y después (CMK-3-DS) de eliminar la plantilla.

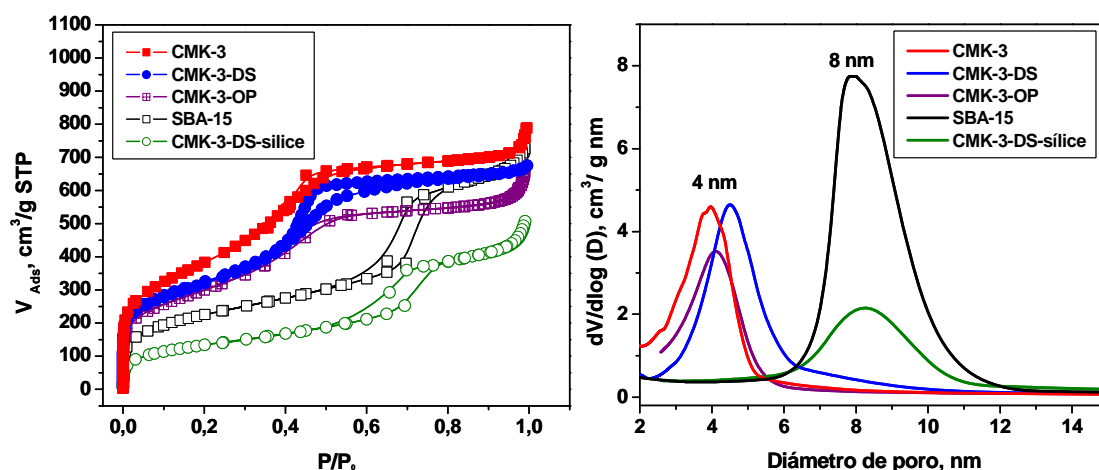


Figura II.3.10. Isotermas de adsorción/desorción de N_2 (izquierda) y distribución de tamaño de poro (derecha) de los materiales de carbón obtenidos por impregnación con sacarosa (CMK-3), síntesis directa (CMK-3-DS) y síntesis en una etapa (CMK-3-OP), y su comparación con la sílice de partida SBA-15. Además, se muestra el análisis del material obtenido por síntesis directa (CMK-3-DS-sílice) antes de eliminar la plantilla de sílice.

Se observa que para los materiales CMK-3 obtenidos por diversos métodos no existen diferencias apreciables en la forma de las isothermas o en la distribución de tamaño de poro. En todos los casos las isothermas son de tipo IV con ciclos de histéresis de tipo H1. Además, los tamaños de poro calculados a partir de la rama de adsorción de la isoterma mediante el método BJH son similares. Por otro lado, la forma de la isoterma de adsorción/desorción y la distribución de tamaño de poro del material compuesto por sílice/carbón (CMK-3-DS-sílice) son muy parecidos a los correspondientes al SBA-15. Sin embargo, el cálculo de los parámetros texturales indica que la superficie específica (470 m²/g), el diámetro de poro (8 nm) y el volumen total de poro (0.78 cm³/g) del material de sílice/carbón son menores que los de la sílice, tal y como cabe esperar. Esto puede explicarse dado que el CMK-3-DS-sílice consiste en una estructura sílicea mesoporosa con poros rellenos de carbón que tras la eliminación de la plantilla da lugar al material CMK-3-DS. Los parámetros texturales [434] se muestran en la Tabla II.3.2.

Tabla II.3.2. Parámetros texturales de los materiales de sílice SBA-15 y de los materiales de carbón CMK-3 obtenidos mediante diversas estrategias de impregnación.

	S_{BET} , m ² /g	V_{T} , cm ³ /g	V_{up} , nm	a_0 , nm	D_{p} BHJads, nm	t_{w} , nm
SBA-15	800	1.10	0.04	11.3	8.0	3.3
CMK-3	1300	1.05	0.10	9.7	4.3	—
CMK-3-DS	1130	1.00	0.10	9.8	4.2	—
CMK-3-OP	900	0.98	0.10	9.8	4.1	—
SBA15-5d	850	1.42	0.01	11.7	9.8	2.4
CMK-3-5d	1500	1.57	0.02	10.1	4.2	—

S_{BET} : superficie específica B.E.T.

V_{T} : volumen total de poro

V_{up} : volumen de microporo (t -plot)

a_0 : parámetro de red calculado a partir de XRD mediante la fórmula $a_0 = 2d_{10}/\sqrt{3}$

D_{p} : diámetro de poro (BJH adsorción)

t_{w} : espesor de pared calculado para la sílice mediante la fórmula $t_{\text{w}} = a_0 - D_{\text{p}}$

DS: síntesis directa (*direct synthesis*)

OP: síntesis en una sola etapa (*one-pot synthesis*)

Para estudiar el efecto del tamaño de poro de la plantilla de sílice en la estructura del carbón obtenido, se ha sintetizado un SBA-15 de mayor diámetro y volumen de poro, SBA-15-5d, alargando el tratamiento hidrotermal a 5 días. Mediante impregnación con sacarosa se ha obtenido el correspondiente carbón denominado CMK-3-5d, como réplica inversa del SBA-15-5d. Las isothermas de adsorción/desorción de N₂ para el

SBA-15-5d y el CMK-3-5d se muestran en la Figura II.3.11, y sus parámetros texturales se muestran en la Tabla II.3.2.

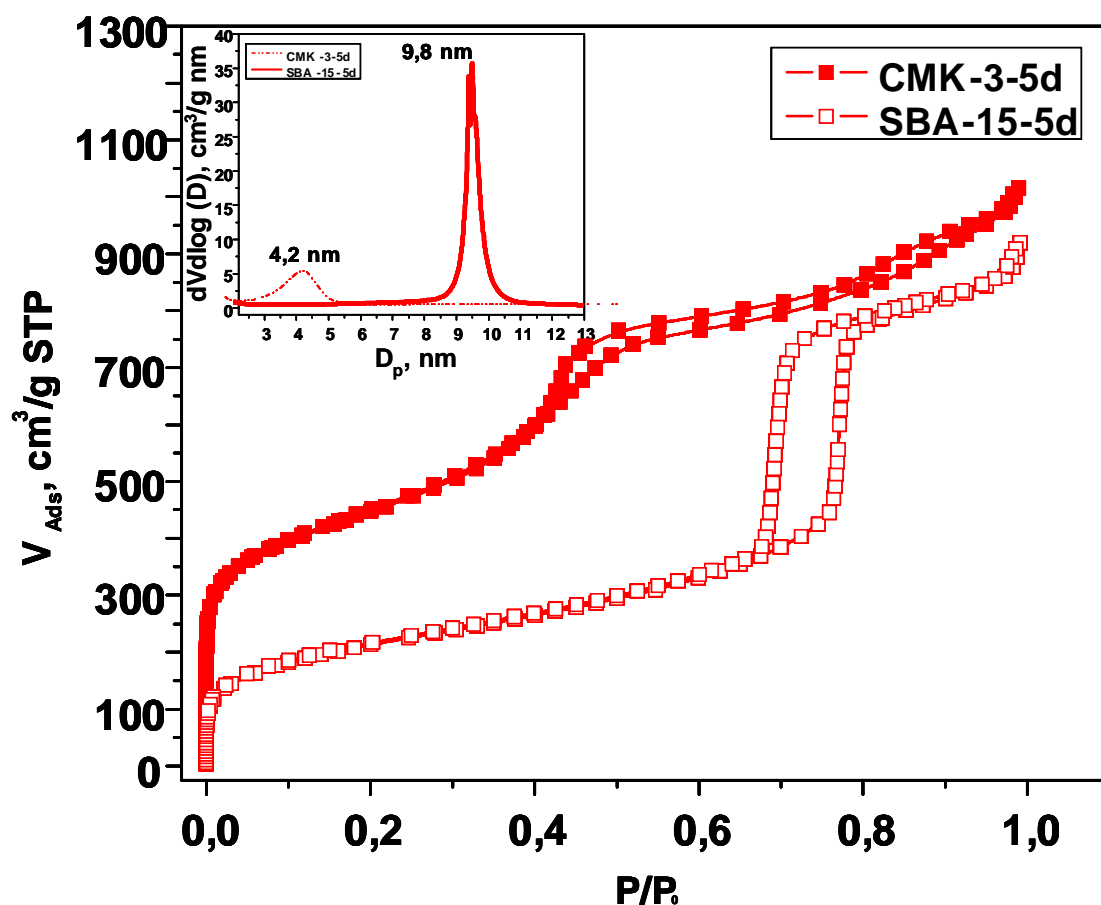


Figura II.3.11. Isothermas de adsorción/desorción de N_2 del material de sílice SBA-15-5d obtenido mediante tratamiento hidrotermal prolongado y del material de carbono CMK-3-5d obtenido por nanomoldeo. La distribución de tamaño de poro se muestra en la gráfica interior.

En la Tabla II.3.2 se observa que el SBA-15-5d muestra un mayor tamaño de poro en comparación con el SBA-15 (9.8 nm frente a 8.0 nm) y un menor espesor de la pared de sílice entre poros adyacentes (2.4 nm frente a 3.3 nm), de acuerdo con el efecto esperado por tratamiento hidrotermal prolongado [20]. Asimismo, el parámetro de celda disminuye al pasar de la sílice (11.7 nm) al carbón (10.1 nm) debido a la contracción de la estructura tras la carbonización. Sin embargo, el tamaño de poro del carbón CMK-3-5d apenas se ve modificado, si bien el espesor de la pared del SBA-15-5d es menor [440], lo cual idealmente daría lugar a un carbón con menor tamaño de poro. Este efecto ha sido descrito con anterioridad para carbones obtenidos a partir de sílices mesoporosas de tamaño de poro creciente sintetizadas con tratamiento hidrotermal a temperaturas

superiores a 100 °C [304.437]. En general, carbones obtenidos a partir de sílices con mayor diámetro de poro, dan lugar a carbones con mayor diámetro de poro y menor diámetro de los tubos de carbón. Una posible explicación pudiera ser que el método empleado para calcular el espesor de la pared de sílice sometida a tratamiento hidrotermal prolongado o a alta temperatura subestimase tal parámetro.

Con el objetivo de comparar la efectividad del método de impregnación incipiente con la del método impregnación tradicional con sacarosa, se ha sintetizado un carbón CMK-1 por ambos métodos y se han analizado sus propiedades texturales mediante adsorción de N₂. En la Figura II.3.12 se muestran y comparan las isothermas de adsorción/desorción de N₂ de los CMK-1 preparados mediante impregnación incipiente e impregnación tradicional con sacarosa. Los datos sugieren un aumento en la superficie específica cuando los materiales se obtienen mediante impregnación incipiente. Así, se ha observado que la superficie específica del carbón CMK-1 varía desde 860 m²/g a 1640 m²/g y el volumen total de poro de 0.60 cm³/g a 0.95 cm³/g al emplear el método de impregnación incipiente. No obstante, el tamaño de poro apenas se ve modificado, variando de 3.3 nm a 4.1 nm.

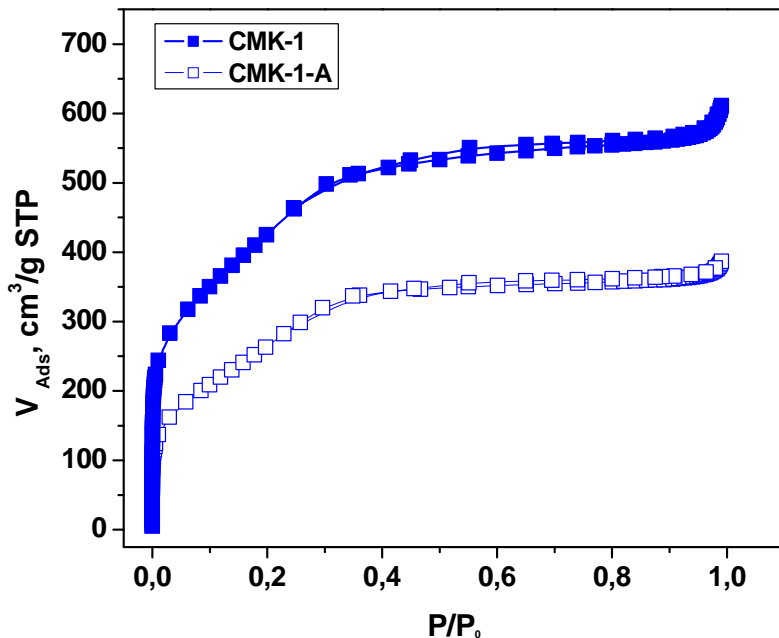


Figura II.3.12. Isothermas de adsorción/desorción de N₂ del material de carbono CMK-1 obtenido mediante impregnación incipiente (CMK-1) y mediante impregnación tradicional (CMK-1-A).

En este sentido, el aspecto más importante es optimizar las proporciones sacarosa-sílice y sacarosa-ácido sulfúrico en función del volumen de poro de la plantilla de sílice. Dado que un mayor grado de infiltración del precursor de carbono produce estructuras ordenadas de mayor calidad, el control de las proporciones mencionadas asegura que la mayor parte de la sacarosa está localizada en el interior de los poros frente a la

superficie externa del material. Cabe mencionar que para el caso anteriormente descrito no se trata de un proceso de impregnación incipiente en sentido estricto, ya que no se restringe el volumen de la disolución al volumen total de poro de la matriz a impregnar. Sin embargo, este procedimiento mejorado presenta ventajas frente a la impregnación basada en la mera dispersión de la matriz en polvo en una disolución diluida, como demuestran los resultados de adsorción/desorción de N_2 . Durante el proceso de impregnación se producen numerosos cambios en la plantilla. El precursor de carbón evoluciona químicamente y origina tensiones en la red de sílice. En algunos casos puede ocurrir incluso que, debido a la reducción de volumen del precursor de carbono al polimerizar en el interior de los poros, se produzca un llenado heterogéneo de los mismos.

Los carbones obtenidos mediante este procedimiento pueden mostrar, en general, gran variedad de tamaños de poro, conectividad o espesor de la pared en función de la estructura y el diámetro de poro de las plantillas de sílice utilizadas. Hay que tener en cuenta que lo más probable es que el precursor de carbono disuelto en agua, como en el caso de la impregnación con sacarosa, pueda alterar la estructura de la sílice modificando el orden a largo alcance o la distribución de tamaño de poro característica de la sílice mesoporosa ordenada. Este efecto se puede producir bien por las elevadas temperaturas de la carbonización (900 °C) o bien por el vapor de agua liberado durante este proceso, debido posiblemente a una sobrepresión en los poros.

El estudio mediante espectroscopía FTIR de la variación en la composición química de la superficie de los materiales sintetizados es interesante para interpretar los cambios estructurales observados. La Figura II.3.13 (a,b) muestra los espectros FTIR de los materiales de carbón CMK-3 y C-ORN-1 en las distintas etapas del proceso de nanomoldeo. En ambos casos los espectros muestran una banda ancha entre 3400 y 3440 cm^{-1} atribuida a la vibración ν_{OH} de las moléculas de agua adsorbidas, así como el modo de deformación característico δ_{HOH} a 1620-1635 cm^{-1} . En el caso del CMK-3, la aparición de las bandas típicas de la sílice como son la vibración antisimétrica y simétrica del enlace Si-O-Si (ν_{SiO}) a 1085 cm^{-1} y a 800 cm^{-1} , la vibración antisimétrica del enlace Si-OH a 961 cm^{-1} y la banda de deformación δ_{OSiO} a 456 cm^{-1} en el espectro del material de carbón final, indicaría la incompleta eliminación de la plantilla de sílice. Tal y como muestra la Figura II.3.13 (a), dichas bandas tan sólo se observan en el

espectro del material de sílice de partida y en del material tras la carbonización, desapareciendo por completo en el material de carbón final. En el caso de las muestras sílice/carbón y carbón, se observa además la vibración de esqueleto de los enlaces C=C de la estructura aromática polinuclear en torno a 1600 cm^{-1} y débilmente la vibración de esqueleto C-H a 1200 cm^{-1} [318]. Además, el espectro FTIR del carbón tras eliminar la plantilla de sílice mediante tratamiento en medio básico no presenta bandas asociadas a grupos C=O a 1700 cm^{-1} , indicando que el tratamiento alcalino no ha oxidado la superficie del material de manera notable y confirmando que las propiedades estructurales del material no han sido modificadas. Por otro lado, tal y como se muestra en la Figura II.3.13 (b), el espectro FTIR del material C-ORNL-1 muestra las bandas típicas del resorcinol y del Pluronic F127 [441].

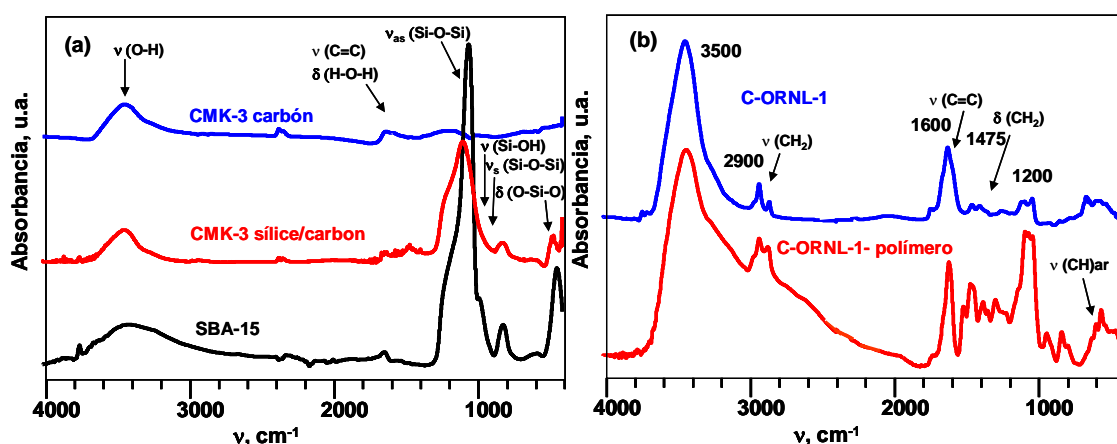


Figura II.3.13. Espectros FTIR de los materiales (a) CMK-3 y (b) C-ORNL-1 en diferentes etapas del proceso de nanomoldeo.

De forma complementaria, en la Figura II.3.14 se muestran los espectros Raman de los carbones sintetizados. En un grafito hexagonal, el espectro Raman muestra la banda G (carbón grafitico, CG), la cual se asigna al desplazamiento de los átomos de carbono en el plano de láminas hexagonales. La banda D (carbón amorfo, CA) puede también aparecer y suele corresponder a un segundo máximo en la densidad de estados vibracionales de pequeños cristallitos de carácter grafitico, y por ello está asociada generalmente a desorden en la estructura. En la Figura II.3.14 se observa que para todos los carbones sintetizados, el espectro Raman muestra una banda D ancha y una banda G alrededor de 1360 y 1590 cm^{-1} , respectivamente. La existencia de ambas bandas indica que se trata de carbón amorfo o de grafito desordenado confirmando así la naturaleza desordenada a escala atómica de la red de carbono que forma las paredes de los poros de

los materiales sintetizados, en buen acuerdo con la difracción de rayos X a alto ángulo. Es preciso destacar que la intensidad absoluta de las bandas depende de la potencia del láser empleado. Sin embargo, es la intensidad relativa de las dos bandas mencionadas la que determina el grado de desorden gráfico.

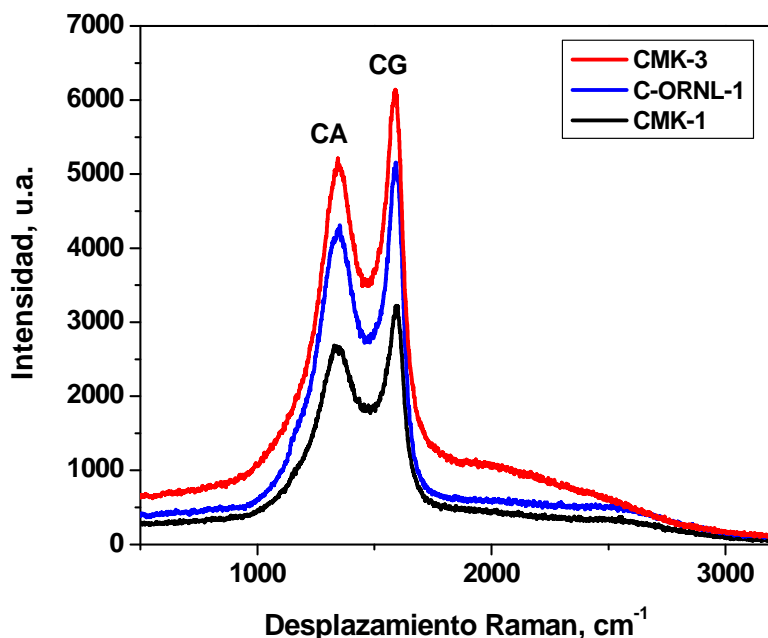


Figura II.3.14. Espectros Raman de los carbones mesoporosos ordenados tras la eliminación de la plantilla de sílice.

Parece que el hecho de que los carbones obtenidos sean o no grafitizables depende en mayor medida de la fuente de carbono empleada [333]. Una de las características especiales del material de carbono C-ORNL-1 es que es grafitizable a elevada temperatura, conservando la estructura mesoporosa durante el proceso.

La Figura II.3.15 muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los materiales de sílice calcinados empleados como plantilla. Las imágenes muestran la morfología típica *rope-like* de las partículas de SBA-15, así como la morfología de aglomerados esféricos característica de las partículas del material MCM-48 [412]. Por otro lado, la Figura II.3.16 muestra las imágenes de SEM de los carbones sintetizados empleando sendos materiales de sílice como plantilla, así como las del carbón C-ORNL-1, que no utiliza plantilla de sílice. Las imágenes muestran que la morfología característica de las partículas de sílice se conserva en el carbón tras el proceso de nanomoldeo. En el caso del material C-ORNL-1, la morfología de las partículas no es característica ya que depende del tratamiento mecánico de molienda al que se somete la resina polimérica tras el curado, polimerización y carbonización.

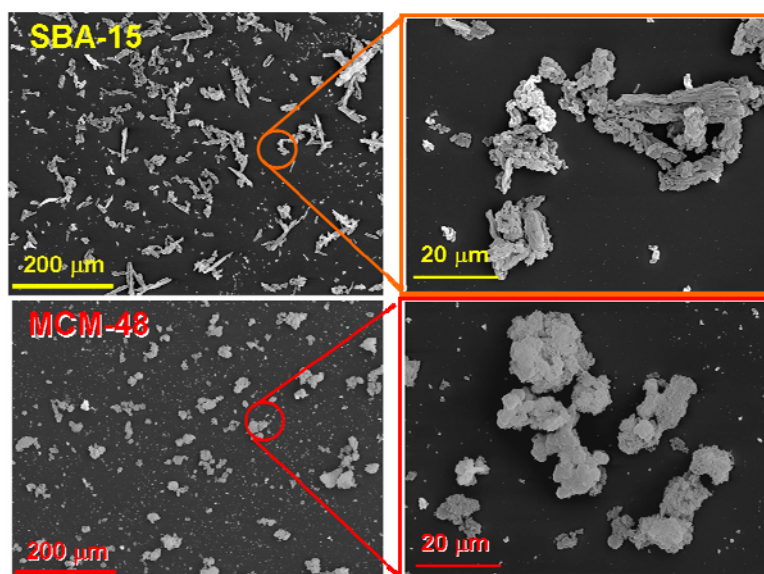


Figura II.3.15. Micrografías de SEM de los materiales mesoporosos de sílice SBA-15 y MCM-48.

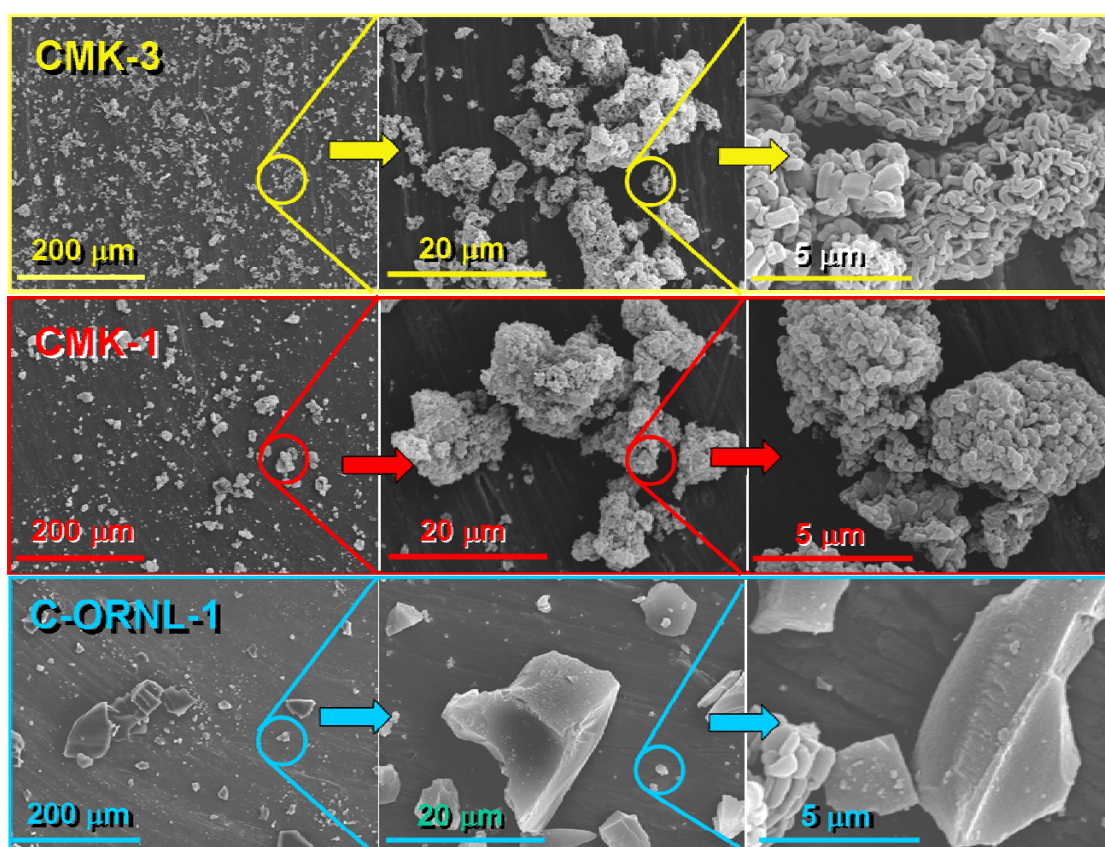


Figura II.3.16. Micrografías de SEM de los materiales mesoporosos de carbón CMK-3, CMK-1 y C-ORN-1.

La Figura II.3.17 muestra los termogramas (TGA/DTA) en atmósfera de aire de los intermedios correspondientes a las etapas de síntesis de los carbones CMK-3 y CMK-1 mediante el método de impregnación con sacarosa.

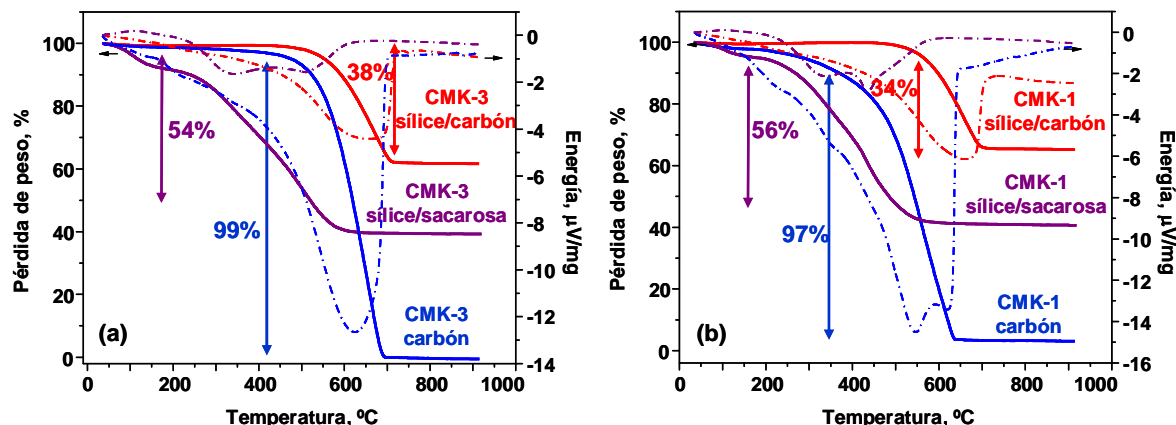


Figura II.3.17. Análisis termogravimétrico (TGA) en flujo de aire de los materiales intermedios de las etapas sintéticas de los carbones (a) CMK-3 y (b) CMK-1.

El porcentaje de carbón contenido en los composites sílice/sacarosa y sílice/carbón se ha estimado a partir de la pérdida de peso tras su combustión en atmósfera de aire. La pérdida de peso a temperaturas inferiores a 100 °C representa un 4–8 % en todos los casos, y se debe a la desorción del agua fisisorbida en la superficie de los materiales. La mayor pérdida de peso registrada entre 200 °C y 700 °C se atribuye a la combustión de la materia orgánica, ya que se ha observado que en ese rango la contribución de la deshidroxilación de la sílice es insignificante (*ca.* 1%). A temperaturas superiores a los 700 °C, tan sólo se observa una pequeña pérdida de peso, indicando que la combustión de la materia orgánica ya es completa a esa temperatura, la cual es mucho menor que la descrita para nanotubos de carbono y otros carbones grafiticos. Esta observación confirma la naturaleza no grafitica de las redes de carbón sintetizadas. Tal y como se observa en la Figura II.3.17, tanto para el CMK-3 como para el CMK-1, la pérdida de peso observada tras la impregnación en la etapa sílice/sacarosa es de alrededor de un 60 %. Por otra parte, en la etapa sílice/carbón, la pérdida de peso registrada es de alrededor de un 20 % al emplear la síntesis directa, cerca de un 40 % para los materiales obtenidos mediante impregnación incipiente con sacarosa y ligeramente mayor cuando se emplea la aproximación de síntesis en una sola etapa. Este valor da una idea de la cantidad de carbón que es posible incorporar mediante los diferentes métodos ensayados. Además, a partir del análisis de la diferencia de pérdida de peso del material impregnado antes y

después de la etapa de carbonización, es posible estimar en un 30 % en peso el rendimiento de la conversión de sacarosa en carbón.

En el caso de los materiales obtenidos en la síntesis en una sola etapa, en la que tanto el surfactante P123 como la sacarosa actúan como fuente de carbono, el rango de temperaturas en el que se produce la combustión de materia orgánica se sitúa entre el de la sacarosa y el del surfactante por separado, tal y como se describe en la bibliografía [419]. Se ha postulado que este resultado puede indicar la existencia de algún tipo de interacción de tipo enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la sacarosa y las regiones hidrofílicas de las moléculas de surfactante [419].

La Figura II.3.18 muestra los termogramas (TGA/DTA) en atmósfera de argón del material Pluronic F127-resorcinol, que constituye una etapa intermedia en la síntesis del carbón C-ORNL-1. Se observa una pérdida de peso acusada entre 250 °C y 400 °C que, de acuerdo con la bibliografía, corresponde con la descomposición del F127 [315]. Así se demuestra que el tratamiento térmico en atmósfera de Ar a 400 °C permite eliminar el F127. La posterior carbonización del polímero mesoporoso de resorcinol a 850 °C en atmósfera inerte da lugar al carbón mesoporoso C-ORNL-1.

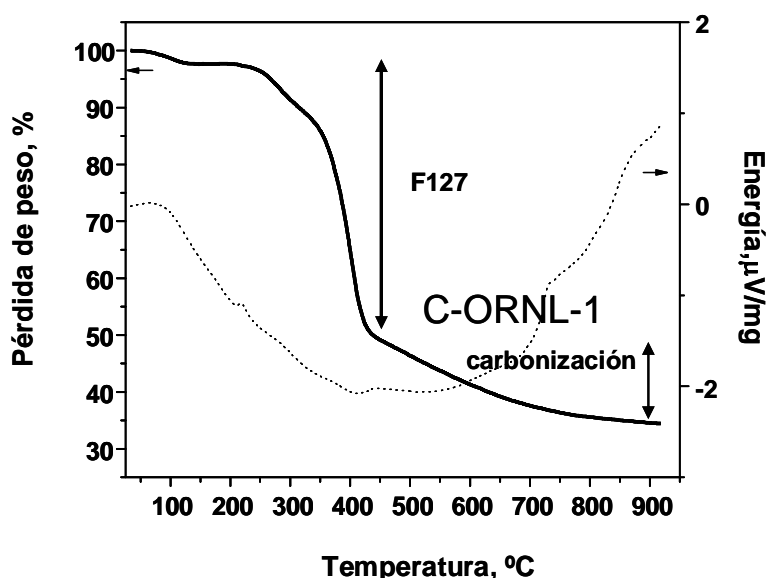


Figura II.3.18. Termograma del material de F127-resorcinol en corriente de Ar.

Es sabido que la sílice reacciona con ácido fluorhídrico (HF, 5 %) a temperatura ambiente mediante la siguiente reacción [442]:



o bien se disuelve en NaOH 1M a 100 °C ó KOH 1M a 180 °C [416] a pH superiores 11. Los termogramas de los materiales de carbón obtenidos tras la eliminación de la plantilla de sílice mediante los tratamientos descritos se muestran en la Figura II.3.19. El análisis de la pérdida de peso entre 200 °C y 700 °C muestra que el contenido en sílice tras el tratamiento con NaOH o HF es menor del 5 % en peso, indicando que ambos métodos son igualmente efectivos para la disolución de la plantilla de sílice.

Sin embargo, el HF es extremadamente tóxico y corrosivo por lo que su manipulación requiere gran precaución. El tratamiento alcalino con KOH a 180 °C es también un método efectivo, sin embargo permite eliminar una menor cantidad de sílice y tiene el inconveniente de que es más agresivo que el tratamiento con NaOH a 100 °C, lo cual puede afectar al orden de la estructura porosa. Por ello, se ha decidido que para nuestros propósitos el método óptimo consiste en utilizar NaOH, siguiendo el procedimiento descrito en la sección II.2.2.

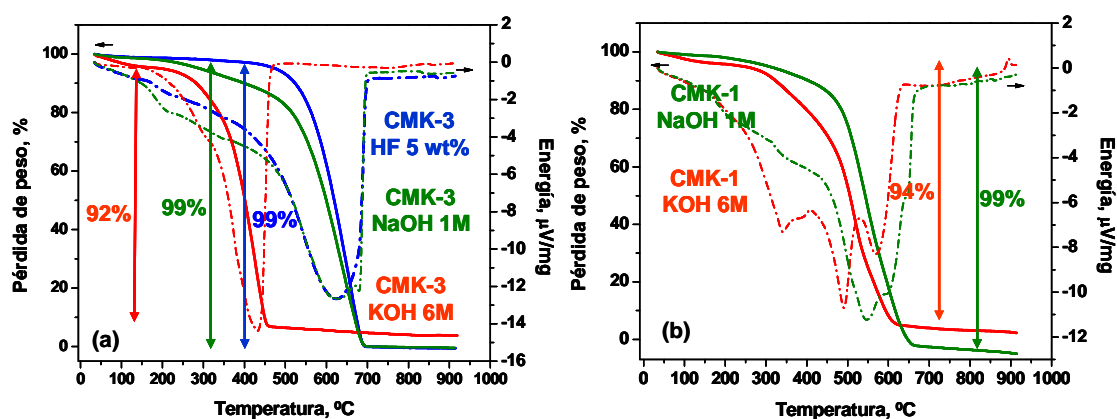


Figura II.3.19. Termogramas en corriente de aire de los carbones (a) CMK-3 y (b) CMK-1 tras la eliminación de la plantilla de sílice por diversos métodos.

El espectro de ^{13}C CP/MAS NMR del carbón mesoporoso CMK-3 se muestra en la Figura II.3.20. Se observa un máximo ancho centrado alrededor de 130 ppm correspondiente al carbón de hibridación sp^2 de los anillos aromáticos de las láminas de grafeno [443,444].

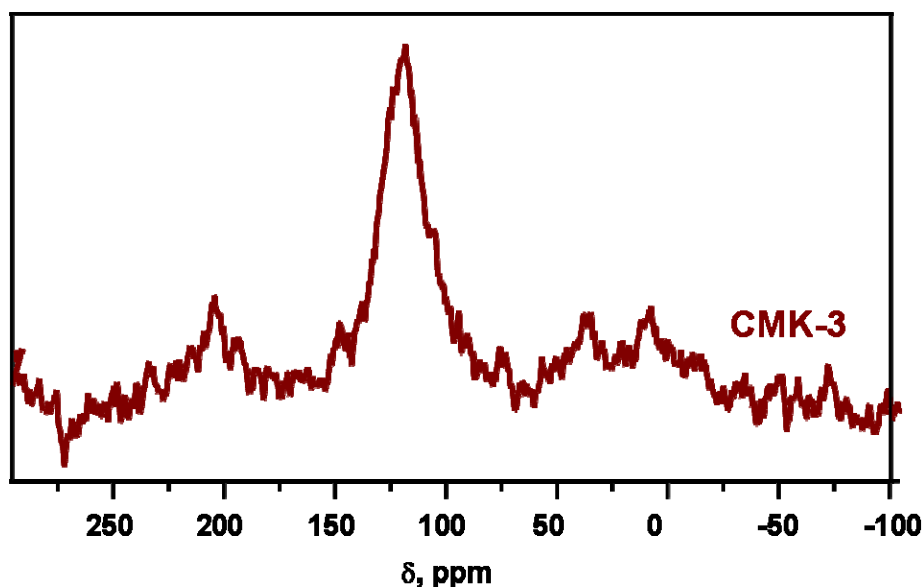


Figura II.3.20. Espectro ^{13}C CP/MAS NMR del material CMK-3.

II.3.2.- MATERIALES DE SÍLICE FUNCIONALIZADOS

La superficie de la sílice presenta generalmente carácter hidrofílico, directamente relacionado con los grupos silanol. Varios estudios han demostrado que la hidrofobización de la superficie de la sílice por reacción de los grupos silanol con moléculas orgánicas que contengan cadenas alquílicas, permite aumentar su estabilidad mecánica e hidrotérmica [445]. Además esta modificación permite expandir las aplicaciones de estos materiales de sílice, por ejemplo como adsorbentes selectivos para moléculas biológicas que posean regiones hidrófobas en su estructura [446], de forma similar a como se comportan los carbones mesoporosos.

Con este objetivo, se ha realizado un tratamiento de hidrofobización de la superficie de la sílice mesoporosa calcinada, de carácter esencialmente hidrófilo. El tratamiento de hidrofobización ha consistido en la incorporación post-síntesis de grupos metilo ($-\text{CH}_3$) en la superficie de la sílice SBA-15 mediante reacción con hexametildisilazano (HMDS). En estas condiciones, tal y como indican los diagramas de SA-XRD correspondientes, los materiales funcionalizados mantienen el orden estructural de los materiales de partida sin variaciones aparentes en los parámetros de red. La funcionalización, por otra parte, produce cambios en la composición de la superficie, como se puede observar mediante espectroscopía FTIR y microanálisis elemental de C, H, N, así como mediante resonancia magnética nuclear (^{29}Si MAS NMR).

En el espectro de FTIR de la Figura II.3.21, la existencia de una pequeña banda de vibración correspondiente al enlace C-H (ν_{CH}) a *ca.* 2900 cm^{-1} junto con la presencia de las bandas correspondientes a la vibración del enlace Si-C (ν_{SiC}) a 697 cm^{-1} y 1278 cm^{-1} , en el material funcionalizado SBA-15-HMDS, confirman la presencia de los grupos orgánicos.

Los resultados de microanálisis elemental de las muestras funcionalizadas permiten hacer una estimación de la cantidad de grupos orgánicos incorporados suponiendo que, ya que el surfactante ha sido completamente eliminado con anterioridad a la reacción de funcionalización, todo el contenido en C procede únicamente de los grupos $-\text{CH}_3$ anclados en la superficie. Por otro lado, el análisis termogravimétrico confirma la pérdida de peso en la región 200–700 $^{\circ}\text{C}$, que corresponde a la materia orgánica incorporada. La Tabla II.3.3 muestra la cantidad de agente funcionalizante incorporado, expresado como mmol/g, calculado mediante ambas técnicas.

Es interesante hacer hincapié en los resultados de ^{29}Si CP MAS NMR de los materiales SBA-15 y SBA-15-HMDS. Así pues, en la Figura II.3.22 se observa que, en el caso de la sílice calcinada, el espectro muestra tres señales a campo alto correspondientes a las unidades siloxano Q^4 a $\delta = -111$ ppm y Q^3 a $\delta = -101$ ppm. La señal correspondiente a los grupos geminales Q^2 suele aparecer a $\delta = -92$ ppm y es muy débil. La posición de las señales está de acuerdo con los valores descritos en la bibliografía para especies de sílice en materiales mesoporosos [447]. El espectro del material funcionalizado SBA-15-HMDS muestra una señal adicional a $\delta = 14$ ppm, denominada M (mononuclear) que corresponde a las especies orgánicas ancladas en la superficie, más específicamente a los átomos de silicio en las unidades $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, tal y como ha sido descrito en la bibliografía [448,449].

Para obtener una estimación de la concentración de grupos funcionales incorporados en la superficie de la sílice, los espectros se han deconvolucionado en picos de tipo gaussiano mediante un ajuste por mínimos cuadrados y las poblaciones relativas de especies, así como la concentración de grupos funcionales, se han determinado como se describe en la bibliografía [450] y en el Apéndice III.2 de esta tesis. Los resultados se muestran en la Tabla II.3.3.

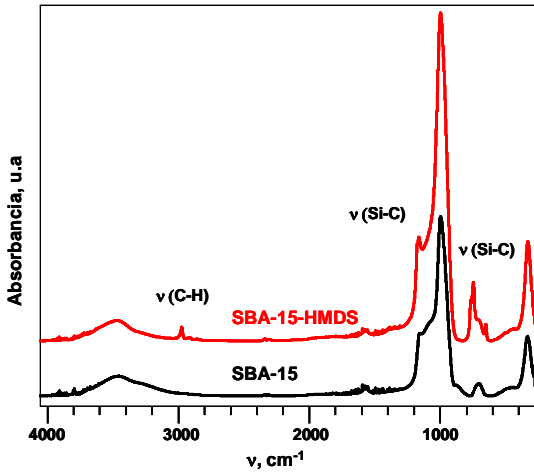


Figura II.3.21. Espectros FTIR del material mesoporoso ordenado de sílice SBA-15 antes y después de la funcionalización con grupos metilo.

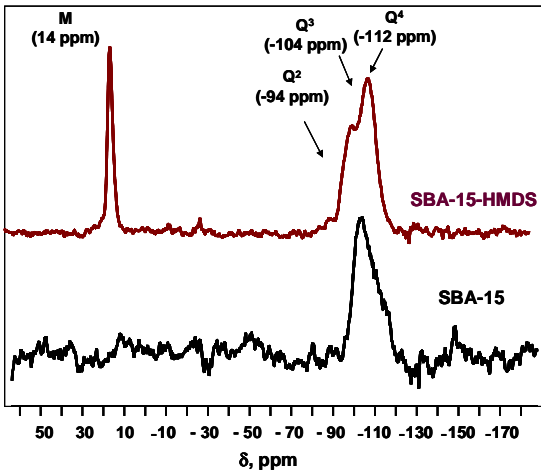


Figura II.3.22. Espectros ²⁹Si CP/MAS NMR del material de sílice SBA-15 y el material de sílice funcionalizado SBA-15-HMDS.

Tabla II.3.3. Poblaciones relativas de las señales obtenidas tras la deconvolución en gaussianas de las señales ²⁹Si CP MAS/NMR de las muestras antes y después de la funcionalización. Cantidad de agente funcionalizante HMDS incorporado (mmol/g) calculado a partir de microanálisis elemental (CHN), termogravimetría (TGA) y ²⁹Si CP MAS/NMR (NMR).

	$Q^4, \%$	$Q^3, \%$	$Q^2, \%$	$M, \%$	TMS, mmol/g, CHN	TMS, mmol/g, TGA	TMS, mmol/g, NMR
SBA-15	93	7	—	—	—	—	—
SBA-15-HMDS-1	82	6	—	12	1.4	3.7	2.2

La disminución en la intensidad de la señal Q^3 en relación a la señal Q^4 junto con la aparición del pico adicional M , indican que el agente funcionalizante se ha unido de mediante enlace covalente a la superficie de la sílice. En general, la funcionalización orgánica conduce a una disminución de la intensidad de la relación Q^3/Q^4 ya que el anclaje covalente de los grupos orgánicos en la superficie implica un aumento en el grado de condensación de la red de sílice.

La Figura II.3.23 muestra las isotermas de adsorción/desorción de N_2 del SBA-15 antes y después de la funcionalización con HMDS. Se observa que la reacción de funcionalización conlleva una reducción de los parámetros texturales como consecuencia del enlace covalente de las especies orgánicas en la superficie. Así, el

material SBA-15-HMDS muestra una superficie específica de 466 m²/g, un volumen de poro de 0.93 nm y un diámetro de poro de 8.5 nm (para comparaciones con la sílice de partida, ver Tabla II.3.1).

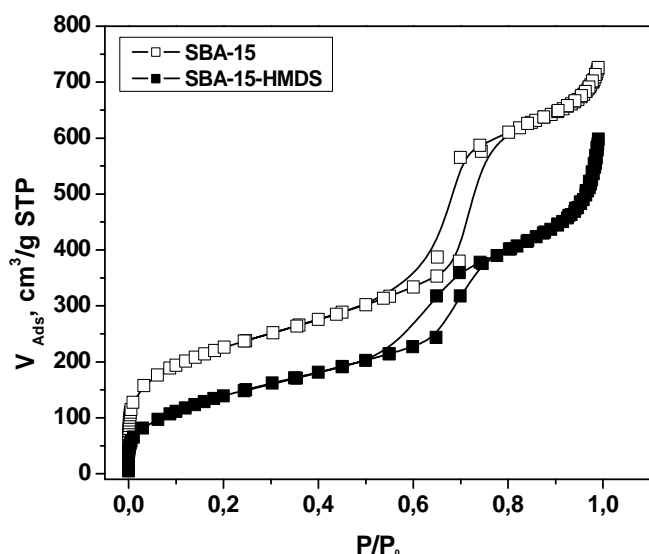


Figura II.3.23. Isotermas de adsorción/desorción de N₂ del material SBA-15 antes y después de la funcionalización de su superficie con HMDS.

II.3.3.- POLARIDAD DE LAS SUPERFICIES

II.3.3.1.- Desorción de agua por termogravimetría

Un modo de evaluar la hidrofiliicidad de los materiales de sílice y de carbón sintetizados consiste en el estudio de la cantidad de agua que son capaces de adsorber. La pérdida de peso registrada tras exponer los materiales secos a una corriente de gas inerte saturado de humedad hasta que el peso es constante, permite estudiar la interacción de la superficie de los materiales con las moléculas de agua. La adsorción de agua en la superficie de la sílice se debe principalmente a interacciones de naturaleza polar de las moléculas de agua con los grupos silanol. En función de la energía de interacción con la superficie, se pueden distinguir tres tipos distintos de agua adsorbida. El agua fisisorbida se desorbe en el rango de temperatura 40–130 °C ya que las fuerzas polares de unión con la superficie son débiles. Las temperaturas superiores a 400 °C provocan la pérdida de agua unida por enlace químico y favorecen la condensación de grupos silanol dando lugar a enlaces siloxano (Si-O-Si) con la consiguiente eliminación de moléculas de agua. Finalmente, el agua unida mediante enlace de hidrógeno se elimina en el rango de temperatura 200–400 °C ya que implica fuerzas polares de interacción más fuertes [451]. Parte de la contribución a la pérdida de peso en dicho rango también viene dada

por la condensación de grupos silanol geminales. La Figura II.3.24 muestra de manera conjunta los termogramas de los materiales de carbón y de sílice. La Tabla II.3.4 muestra la pérdida de peso en el rango de temperatura 40–400 °C para la sílice SBA-15 calcinada y también funcionalizada, así como para los materiales de carbón.

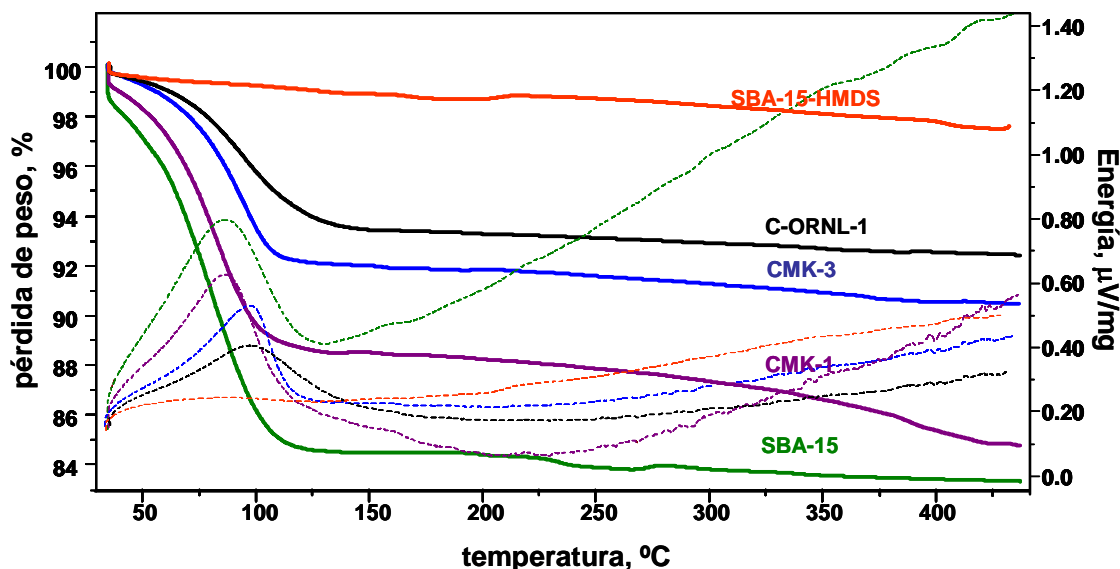


Figura II.3.24. Termogramas de desorción de agua en corriente de argón para los materiales de sílice y de carbón.

Tabla II.3.4. Pérdida de peso correspondiente al agua adsorbida en materiales de sílice y de carbón, registrada por termogravimetría en el rango 40–400 °C.

Material	Pérdida de peso, %
SBA-15-HMDS	1.3
C-ORNL-1	6.4
CMK-3	8.7
CMK-1	11.0
SBA-15	14.4

De acuerdo con la Figura II.3.24 y la Tabla II.3.4, el material de sílice SBA-15 presenta la mayor pérdida de peso en el rango de temperaturas estudiado, a continuación se encuentran los materiales de carbón y finalmente la sílice funcionalizada. Estas observaciones indican que la hidrofiliidad de los materiales estudiados está influida por el número de grupos hidroxilo accesibles a las moléculas de agua, si bien la pérdida de peso registrada se debe principalmente al agua débilmente fisisorbida, siendo minoritaria la contribución del agua unida por enlace de hidrógeno. Por un lado, el SBA-15 es hidrófilo y presenta el mayor número de grupos silanol en superficie en

comparación con el resto de materiales. La cantidad de grupos silanol en la superficie de la sílice calcinada se ha calculado en numerosas ocasiones por diversos métodos [452]. En concreto, la cuantificación a partir de medidas termogravimétricas de los grupos silanol del material de sílice SBA-15 calcinado, arroja un valor de 12 mmol/g ($8.5 \text{ OH}\cdot\text{nm}^{-2}$) [147,453]. Por otro lado, la sílice SBA-15-HMDS registra la menor cantidad de agua adsorbida, lo cual está de acuerdo con la mayor hidrofobicidad de la superficie debido al proceso de funcionalización con grupos metilo de naturaleza apolar. Los resultados obtenidos para los materiales de carbón indican una cierta hidrofiliidad que puede atribuirse a la existencia de ciertos grupos hidroxilo en la superficie del carbón, resultado del tratamiento alcalino para la eliminación de la plantilla de sílice o bien a restos de sílice no eliminada completamente en el caso de CMK-3 y CMK-1.

Un método adicional para estudiar la hidrofiliidad de materiales de sílice, basado en termogravimetría, podría consistir en registrar la pérdida de peso a temperaturas superiores a 400 °C. En ese caso, la pérdida de peso estaría principalmente relacionada con la condensación de grupos silanol y la consiguiente eliminación de moléculas de agua. Una mayor pérdida de peso podría significar una mayor cantidad de grupos silanol en superficie o bien una disposición espacial de los mismos más favorable para la condensación con otros grupos silanol adyacentes.

II.3.3.2.- Isotermas de adsorción de agua e hidrocarburos

En general, la caracterización de adsorbentes micro y mesoporosos hace uso de moléculas sonda de diferente tamaño, forma y polaridad para estudiar aspectos tales como la estructura porosa, el tamaño efectivo de los poros, la polaridad de la superficie o la estabilidad hidrotermal del material [454]. En la presente tesis, se han empleado medidas de adsorción de agua y de hidrocarburos para llevar a cabo un estudio de la polaridad de la superficie así como de la microporosidad de los materiales de sílice y de carbón sintetizados. La medida de isotermas de adsorción de agua es un método ampliamente utilizado para estudiar la interacción de la superficie de un material determinado con el agua [455]. La Figura II.3.25 muestra las isotermas de adsorción de agua a 25 °C de algunos de los materiales sintetizados.

Las isotermas son de tipo III, típicas de materiales porosos hidrófobos que muestran débil interacción con las moléculas de agua, aunque la isoterma de SBA-15 se aproxima

más a una isoterma tipo V. Existen diferencias apreciables entre el SBA-15 y el SBA-15-HMDS, tanto en la forma de las isothermas como en el volumen total de agua adsorbida en el punto de saturación. El material de sílice funcionalizada presenta el menor volumen total de agua adsorbida, tal y como cabe esperar debido a la mayor hidrofobicidad de su superficie. Las isothermas de los carbones mesoporosos CMK-1 y CMK-3 presentan un comportamiento más próximo al del SBA-15. Es preciso destacar que, aunque el volumen total de agua adsorbida en el punto de saturación en el caso de la sílice SBA-15 sea similar al registrado para los carbones CMK-1 y CMK-3, la condensación de vapor de agua comienza a P/P_0 menores para la sílice y es siempre superior, demostrando la mayor afinidad de las moléculas de agua por la superficie de la sílice y por tanto una mayor hidrofiliidad, relacionada con la presencia de grupos silanol.

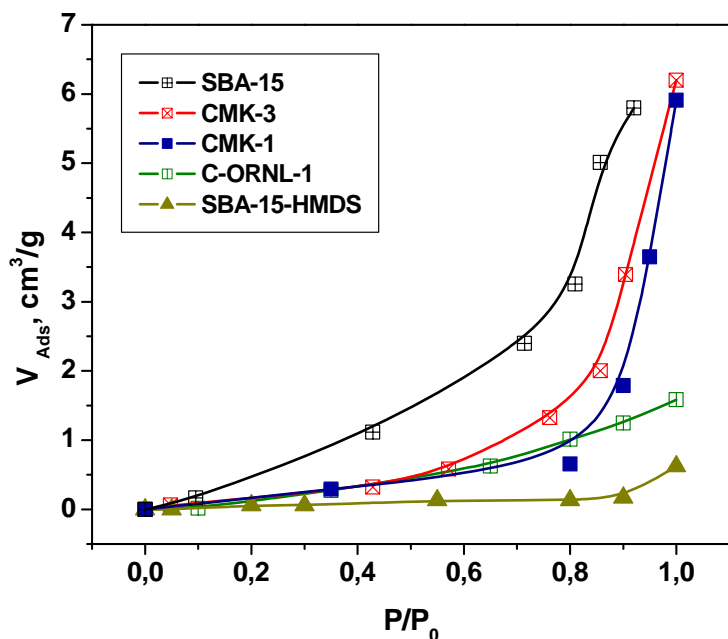


Figura II.3.25. Isothermas de adsorción de agua de los materiales de sílice y de carbón.

La Figura II.3.26 muestra las isothermas de adsorción de dos hidrocarburos de polaridad similar, uno lineal *n*-hexano y otro ramificado 2,2-dimetilbutano (neohexano), a 25 °C para los materiales sintetizados.

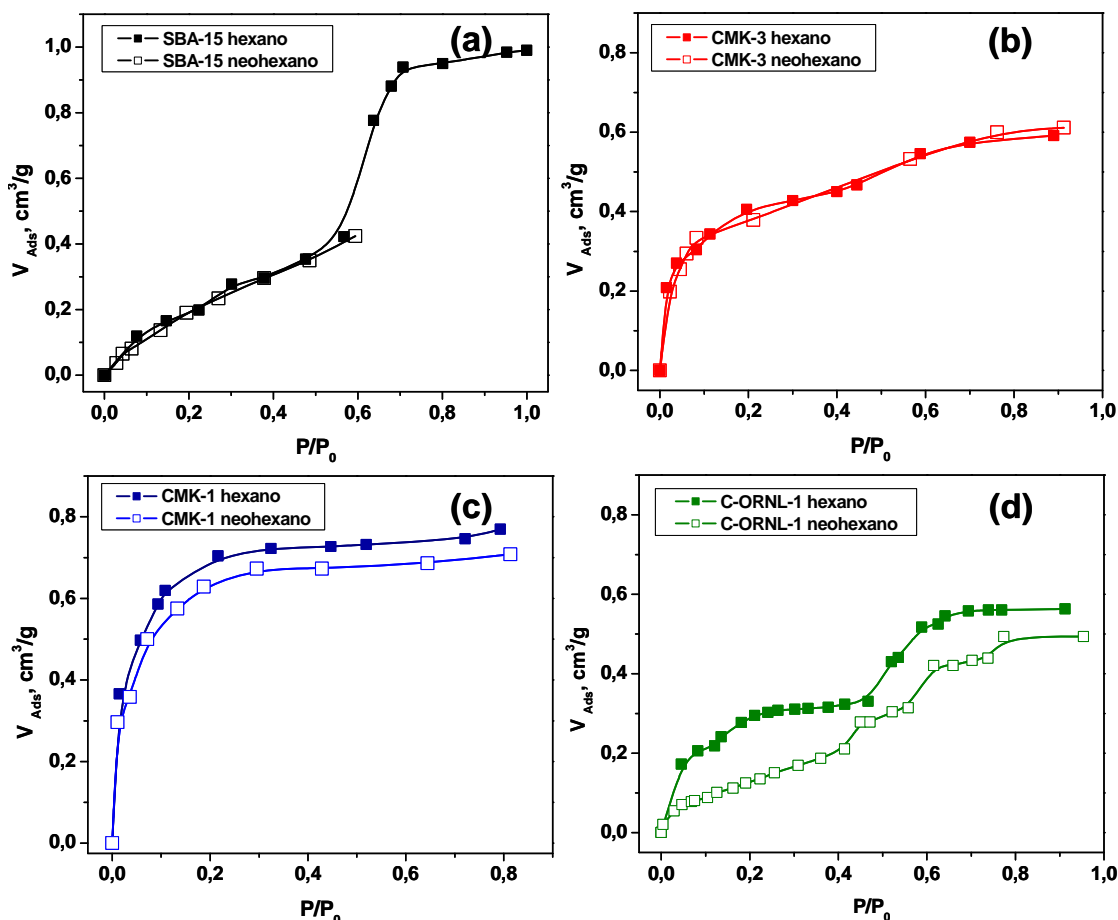


Figura II.3.26. Isothermas de adsorción de *n*-hexano y neohexano para los materiales (a) SBA-15, (b) CMK-3, (c) CMK-1 y (d) C-ORN-1.

Las isothermas de adsorción de la Figura II.3.26 son de tipo IV, al igual que las isothermas de adsorción de N_2 de los materiales ensayados (ver Figura II.3.6), mostrando condensación capilar en el mismo rango de presiones relativas que aquéllas aunque, para el carbón CMK-1 y CMK-3 la condensación capilar en la región de llenado del mesoporo no es tan pronunciada como en los demás materiales. La comparación de las isothermas de adsorción de agua de la Figura II.3.25 con las isothermas de adsorción de hidrocarburos de la Figura II.3.26 permite determinar el efecto de la polaridad del adsorbato. Así, se observan claras diferencias en la forma de las isothermas debido a la diferente polaridad de las moléculas sonda empleadas. Por otro lado, el cálculo del volumen total de poro accesible a los adsorbatos ensayados se ha realizado a partir de la adsorción total de orgánico al finalizar la etapa de condensación en los poros. La cantidad total adsorbida se expresa como volumen de líquido equivalente asumiendo que la densidad de los adsorbatos es igual que la densidad normal del líquido en *bulk* a

la temperatura del experimento de adsorción. Los volúmenes de poro calculados a partir de la adsorción de N₂, *n*-hexano y neohexano se muestran en la Tabla II.3.5.

Tabla II.3.5. Volumen total de poro a $P/P_0 = 0.99$ obtenido a partir de medidas de adsorción de N₂, *n*-hexano (*n*-hex) y neohexano (neohex).

Material	V_T (N ₂), cm ³ /g	V_T (<i>n</i> -hex), cm ³ /g	V_T (neohex), cm ³ /g
SBA-15	1.10	0.97	—
CMK-1	0.95	0.77	0.71
CMK-3	1.05	0.59	0.59
C-ORNL-1	0.63	0.56	0.47

La mayor parte de trabajos publicados sobre caracterización de la porosidad de materiales mesoporosos se basan en cálculos realizados a partir de medidas de adsorción de N₂. Sin embargo, el uso de otros adsorbatos como Ar, CO₂, neopentano, agua o C₆H₆ pueden dar resultados de volumen de poro menores que los que obtenidos usando N₂ [437]. Las diferencias suelen deberse a la incertidumbre en el valor de la densidad de la fase adsorbida la cual suele expresarse empleando las densidades líquidas normales de los adsorbatos a la temperatura del experimento [456]. Además, dado que la molécula de N₂ presenta el menor diámetro cinético (0.36 nm) en comparación con los otros adsorbatos ensayados, *n*-hexano (0.43 nm) y neohexano (0.63 nm) [457], puede empaquetarse mejor y el volumen total de N₂ adsorbido en el punto de condensación resulta en todos los casos mayor. Los volúmenes de poro calculados a partir de la adsorción de *n*-hexano y neohexano son en todos los casos menores que los volúmenes de poro determinados por adsorción de N₂, tal y como se muestra en la Tabla II.3.5. Las diferencias observadas entre los volúmenes de hidrocarburos adsorbidos con respecto al volumen de N₂ pueden ser indicativas de la presencia de microporos [437].

Por otro lado, en base a la comparación del volumen de hexano y neohexano adsorbido a bajas presiones relativas ($P/P_0 < 0.07$), es decir, en la zona de llenado de microporos, es posible llevar a cabo un estudio detallado de la microporosidad de los materiales [454,458,459,460]. Estas medidas se basan en diferencias en la distinta accesibilidad de las moléculas sonda a los microporos, debidas al diferente tamaño molecular (diámetro cinético) de tales adsorbatos. De esta manera, en el caso de que la cantidad adsorbida de ambos hidrocarburos sea similar, se puede concluir que no existe una contribución apreciable de microporosidad. Por el contrario, si existen diferencias siendo menor la

cantidad adsorbida de hidrocarburo de mayor tamaño, entonces se puede afirmar que existen una cantidad apreciable de microporos. La Tabla II.3.6 muestra los datos de adsorción de *n*-hexano y 2,2-dimetilbutano a bajas presiones para los materiales estudiados.

Tabla II.3.6. Datos de adsorción de hidrocarburos a presiones relativas bajas.

Material	adsorción <i>n</i> -hexano ^a		adsorción neohexano ^b	
	P/P_0	Vol, cm ³ /g	P/P_0	Vol, cm ³ /g
SBA-15	0.07	0.119	0.06	0.081
CMK-1	0.05	0.497	0.05	0.440
CMK-3	0.04	0.270	0.04	0.255
C-ORNL-1	0.05	0.243	0.04	0.140

^a diámetro cinético *n*-hexano = 0.43 nm

^b diámetro cinético neohexano = 0.63 nm

De los resultados mostrados en la Tabla II.3.6, se puede concluir que el carbón mesoporoso C-ORNL-1 muestra la mayor contribución de microporos, ya que existe una gran diferencia entre los volúmenes de hidrocarburo adsorbidos a bajas presiones, siendo el volumen adsorbido de neohexano mucho menor en comparación con el de *n*-hexano. En el caso del SBA-15 y de los carbones CMK-1 y CMK-3, las diferencias no son tan apreciables, pero demuestran igualmente la presencia de una contribución de microporos, en buen acuerdo con la bibliografía y con los resultados obtenidos a partir de los datos de adsorción de N₂ (Tabla II.3.1). Sin embargo, es preciso mencionar que en este último caso, el *método t* empleado para calcular la microporosidad de las muestras, usando el modelo de Harkins-Jura para el espesor de la capa adsorbida [461], arroja valores que dependen del rango considerado para esta capa.

En el caso del material C-ORNL-1 existen además diferencias apreciables entre el volumen de *n*-hexano y de neohexano adsorbidos en el punto de condensación, tal y como muestra la Figura II.3.26 (d) y la Tabla II.3.1, lo cual lleva a pensar que existen diferencias en el empaquetamiento espacial de las moléculas de adsorbato también en ese rango de presiones. Así, a $P/P_0 < 0.3$, la diferencia entre el volumen adsorbido de ambas moléculas se debe exclusivamente a la presencia de microporosidad, contribución predominante en ese intervalo, mostrando el adsorbato de menor tamaño molecular una mayor capacidad de adsorción registrada como volumen adsorbido de gas a la temperatura del experimento, tal y como muestra la Tabla II.3.6. Sin embargo, a

$P/P_0 \sim 0.7$, las diferencias se deben tanto a la contribución de la mesoporosidad, tal y como cabe esperar en dicho rango de presiones, como al diferente empaquetamiento de los adsorbatos en el interior de los microporos. Por ello, si se comparan los volúmenes adsorbidos en la región de mesoporos con los de la región de microporos (véase Figura II.3.26 (d)), la diferencia resulta en un valor de *ca.* $0.10 \text{ cm}^3/\text{g}$, el cual está directamente relacionado con la microporosidad del material.

II.3.4.- HIDROXIAPATITA POR PRECIPITACIÓN Y NANOMOLDEO CON CARBÓN MESOPOROSO ORDENADO

En este capítulo se ha sintetizado hidroxiapatita combinando la utilización de plantillas de carbón mesoporoso ordenado y el método convencional de síntesis de apatitas por precipitación. Los materiales de carbono empleados como plantilla en la síntesis de hidroxiapatita han sido los denominados CMK-1, CMK-3 y C-ORNL-1, los cuales han sido sintetizados y caracterizados en la presente tesis (sección II.3.1).

La Figura II.3.27 (a,b) muestra los diagramas de XRD en la región de bajo ángulo y alto ángulo, respectivamente de las muestras de fosfato de calcio tras la calcinación a 600°C , sintetizadas combinando el método de precipitación con la estrategia de nanomoldeo con plantillas de carbono. En la Figura II.3.27 (a) se muestran máximos de difracción característicos de la hidroxiapatita [462], no observándose ninguna otra fase en estos materiales. Por tanto, todas las muestras corresponden a hidroxiapatita pura. En los difractogramas registrados a bajo ángulo mostrados en la Figura II.3.27 (b) se observa un máximo de difracción muy poco intenso y muy ancho para las muestras HA-CMK-1 ($2\theta = 0.94^\circ$), HA-CMK-3 ($2\theta = 1.20^\circ$) y HA-C-ORNL-1 ($2\theta = 1.24^\circ$), las cuales han sido sintetizadas a partir de carbón mesoporoso ordenado (sección II.3.1). Por el contrario, las muestras HA y HA-C no presentan ningún máximo de difracción en esta región, tal y como cabe esperar ya que se han sintetizado sin plantilla de carbón y empleando un carbón activado comercial² sin orden mesoestructural, respectivamente. Así, la presencia del citado máximo de difracción podría indicar la existencia de cierto orden a largo alcance en el rango de la mesoescala en la hidroxiapatita sintetizada como consecuencia del empleo de plantillas de carbón mesoporoso ordenado.

² Las propiedades texturales del carbón activado comercial se han calculado mediante adsorción/desorción de N_2 de igual modo que para los demás carbones ($S_{\text{BET}} = 710 \text{ m}^2/\text{g}$, $V_{\text{T}} = 0.51 \text{ cm}^3/\text{g}$, $V_{\text{up}} = 0.20 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{\text{p}} < 1.5 \text{ nm}$). El diagrama de XRD a bajo ángulo del carbón activado comercial no presenta ningún máximo de difracción.

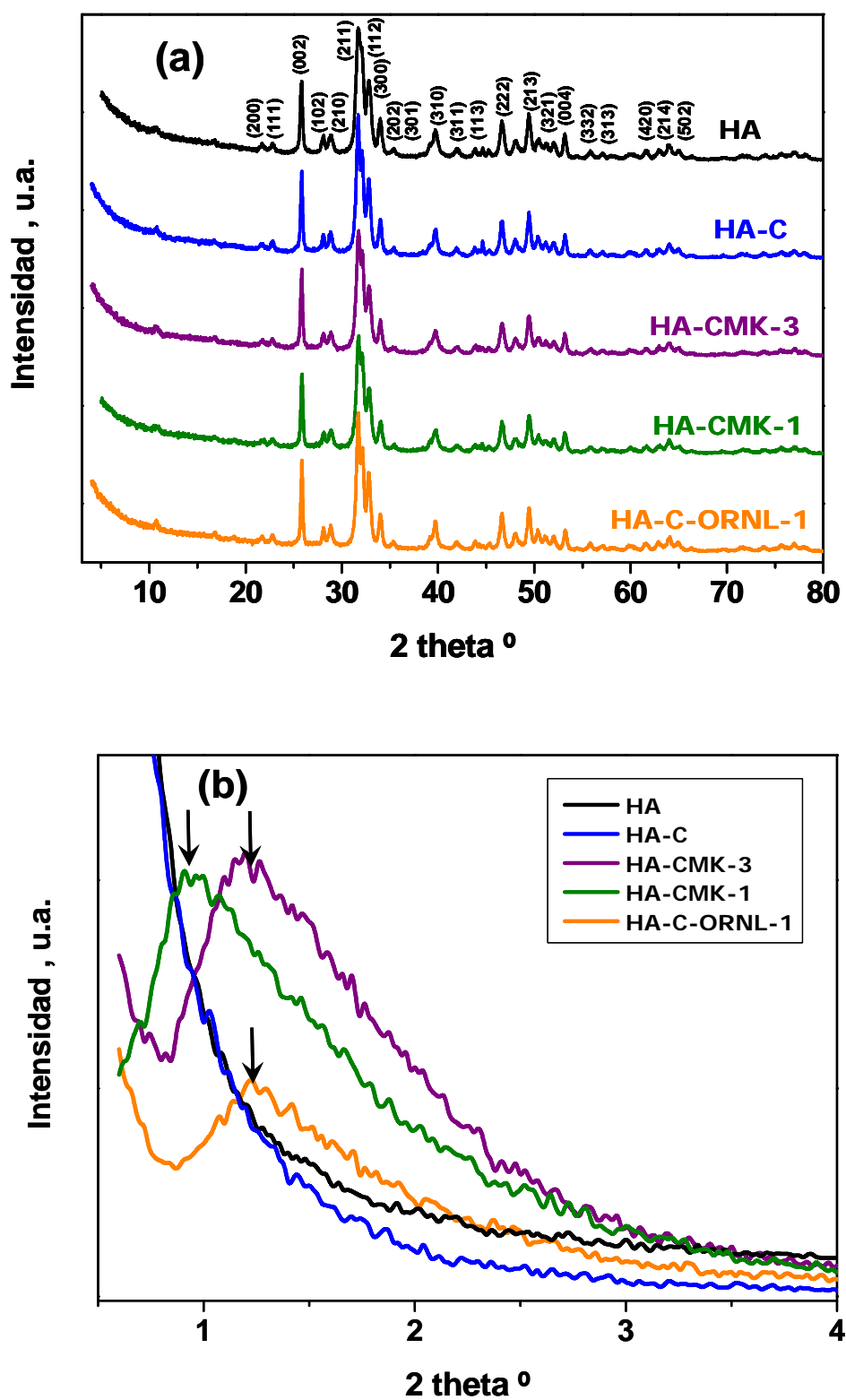


Figura II.3.27. Diagramas de XRD de (a) alto ángulo y (b) bajo ángulo de las muestras de hidroxiapatita calcinadas a 600 °C.

Todos los espectros de infrarrojo (FTIR) de las muestras sintetizadas presentan el mismo perfil correspondiente a hidroxiapatita pura, no apreciándose diferencias significativas independientemente de la presencia de carbón como plantilla durante la síntesis. La Figura II.3.28 ilustra, a modo de ejemplo, los espectros de FTIR de las muestras HA y HA-CMK-3 calcinadas a 600 °C. Las bandas a 3570 cm^{-1} y a 630 cm^{-1} corresponden a modos vibracionales del enlace O-H de los grupos hidroxilo de la estructura. Las bandas a 1088, 1022 y 960 cm^{-1} corresponden a los modos de tensión del enlace P-O de los grupos PO_4^{3-} , al igual que la banda a 474 cm^{-1} , mientras que el doblete a 600 y 560 cm^{-1} corresponde al modo de deformación del enlace O-P-O de los grupos PO_4^{3-} [463,464]. Asimismo se observa una banda en torno a 1630 cm^{-1} que corresponde al agua fisisorbida.

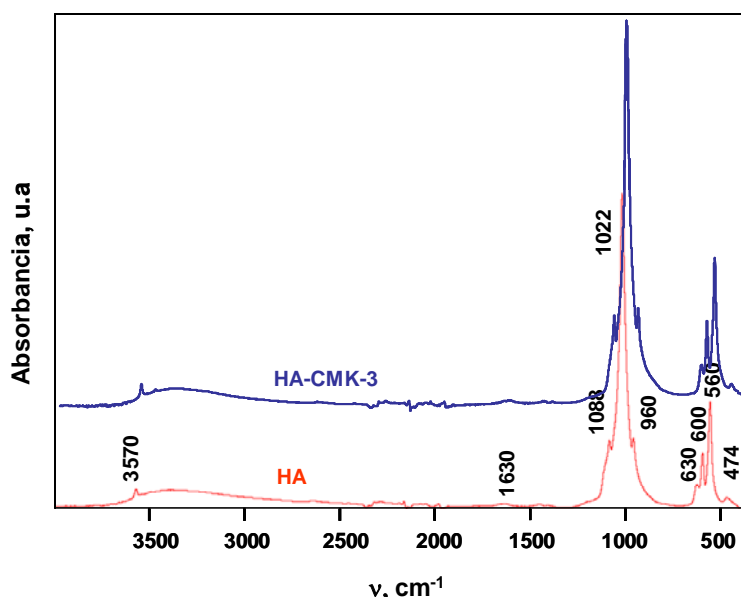


Figura II.3.28. Espectros FTIR de las muestras HA y HA-CMK-3 calcinadas.

La Figura II.3.29 muestra las micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la muestra HA-CMK-3 después de la calcinación a 600 °C. Se observa que el material sintetizado está formado por aglomerados de pequeños cristales aciculares, morfología típica de la hidroxiapatita.

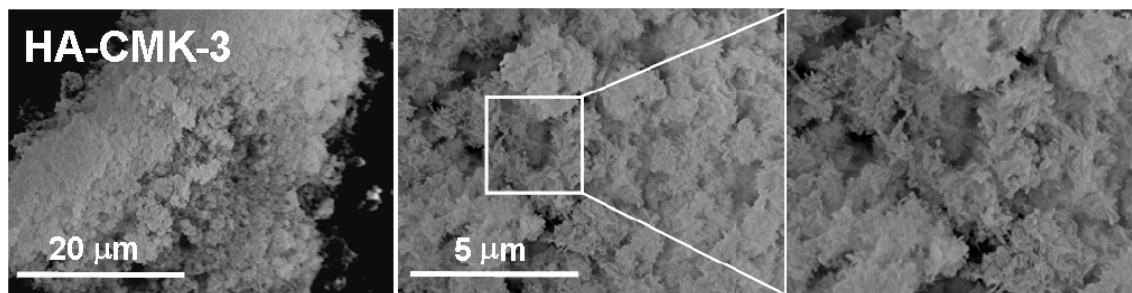
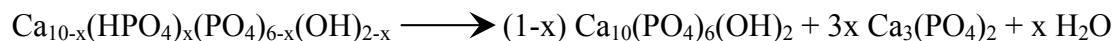


Figura II.3.29. Micrografías de SEM de la hidroxiapatita HA-CMK-3 calcinada.

La relación Ca/P de las muestras sintetizadas se ha determinado por fluorescencia de rayos X (XRF). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.3.7 y están de acuerdo con los resultados obtenidos por análisis de energía dispersiva de rayos-X (EDX) realizados en el microscopio de TEM. En todos los casos la relación Ca/P es menor que la correspondiente a hidroxiapatita estequiométrica (Ca/P = 1.67) [367,368], presentando la muestra HA-CMK-3 el valor más bajo (Ca/P = 1.40). Para determinar la estequiometría de las muestras se ha realizado un tratamiento térmico de las mismas a 900 °C durante 1 hora, ya que esta temperatura es suficiente para producir la transformación de hidroxiapatita deficiente en calcio (CDA) en hidroxiapatita estequiométrica (HA) y fosfato tricálcico (β -TCP). La presencia de grupos HPO_4^{2-} en el material inicial conduce a una mezcla de fases, según la siguiente ecuación [465]:



(ec. II.3.2)

Si la hidroxiapatita de partida es no estequiométrica deficiente en calcio, se producirá la segregación de fases mencionada. En efecto, en la Figura II.3.30 se representa, a modo de ejemplo, el diagrama de XRD del producto resultante tras el tratamiento térmico, HA-CMK-3-900. En análisis del difractograma demuestra la presencia de las dos fases previstas por dicha ecuación, poniendo de manifiesto que se trata de una hidroxiapatita no estequiométrica deficiente en calcio.

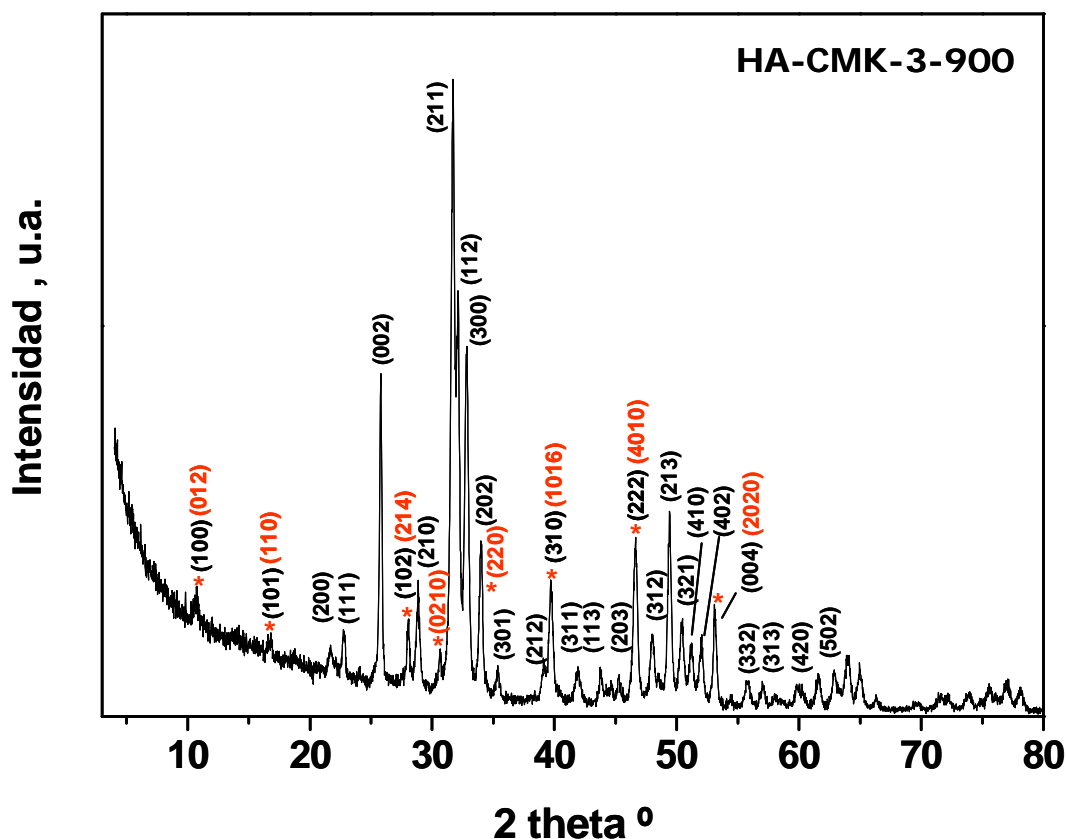


Figura II.3.30. Diagrama de difracción de rayos X de la muestra HA-CMK-3 calcinada y sometida posteriormente a tratamiento térmico a 900 °C. En rojo y con asterisco se indican los máximos de difracción correspondientes a la fase β -TCP.

Tabla II.3.7. Parámetros texturales de las hidroxiapatitas sintetizadas.

Muestra	Ca/P ^a	S_{BET} , m ² /g ^b	V_{T} , cm ³ /g ^c	D_{p} , nm ^d
HA	1.57	38	0.053	3.3
HA-C	1.57	41	0.057	3.2
HA-CMK-1	1.58	65	0.117	3.1
HA-CMK-3	1.40	99	0.153	2.9
HA-C-ORN-1	1.47	57	0.089	3.2

^a Ca/P: relación calcio/fósforo

^b S_{BET} : superficie específica B.E.T.

^c V_{T} : volumen total de poro menor de 20 nm

^d D_{p} : diámetro de poro (BJH adsorción)

Las propiedades texturales de las hidroxiapatitas sintetizadas calcinadas a 600 °C se han estudiado mediante adsorción de N₂. La Tabla II.3.7 muestra un resumen de los parámetros texturales de las hidroxiapatitas sintetizadas. Las isothermas de adsorción/desorción de N₂ se muestran en la Figura II.3.31. Se observa que las

isotermas son de tipo IV con ciclos de histéresis H3, característicos de mesoporos en forma de rendijas planas [396]. La forma alargada de la histéresis a presiones relativas elevadas ($0.97 P/P_0$), indica que pudiera tratarse de adsorción de gas en el espacio entre las partículas aglomeradas [466], tal y como se observa en las imágenes de SEM (Figura II.3.29) y TEM, como se discutirá a continuación.

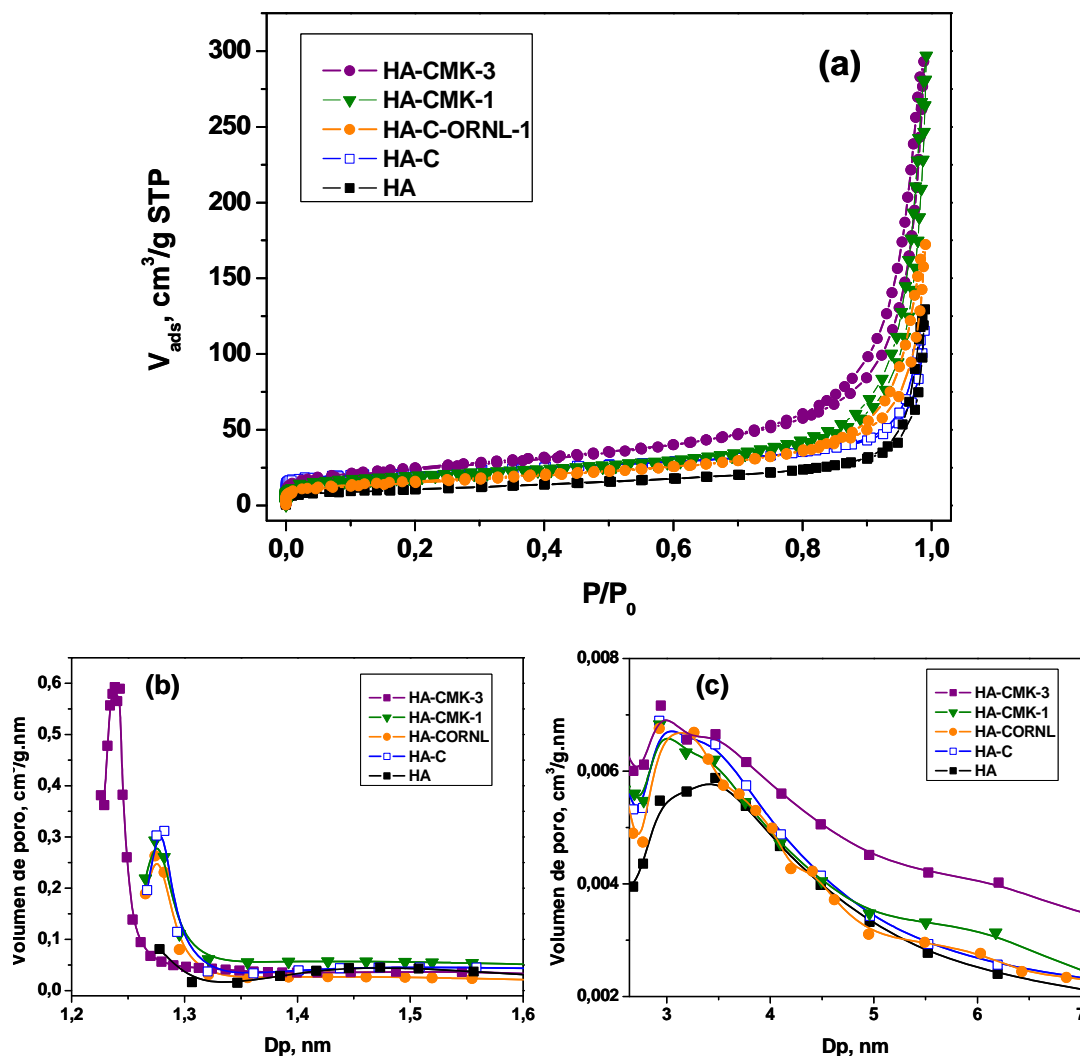


Figura II.3.31. (a) Isotermas de adsorción/desorción de N_2 y (b,c) distribución de tamaño de poro calculado mediante el método BJH, de las hidroxiapatitas sintetizadas.

Las muestras de hidroxiapatita sintetizadas utilizando carbón mesoestructurado muestran superficies específicas ligeramente superiores a las de la hidroxiapatita de referencia (HA) ($38 m^2/g$) sintetizada en las mismas condiciones aunque en ausencia de carbón. Las muestras que presentan los mayores valores de S_{BET} son las sintetizadas en presencia de carbón mesoestructurado ordenado, obteniéndose valores de 57, 65 y 99

m²/g para las muestras HA-C-ORNL-1, HA-CMK-1 y HA-CMK-3, respectivamente. Asimismo, el volumen total de poro de las hidroxiapatitas obtenidas con plantilla mesoporosa de carbón también es superior al de la hidroxiapatita convencional.

La distribución de tamaño de poro de las hidroxiapatitas sintetizadas, calculada a partir de la rama de adsorción de la isoterma mediante el método BJH se muestra en la Figura II.3.31 (b) y (c). Se observa una distribución de microporos menores de 1.5 nm y una pequeña fracción de mesoporos centrada a alrededor de 3 nm. Así, pudiera tratarse de partículas de hidroxiapatita con cierta microporosidad y una ancha distribución de tamaños de poro en el rango de mesoporo la cual corresponde a los espacios interparticulares [467].

La Figura II.3.32 (a,b) muestra imágenes características de TEM adquiridas a bajos aumentos, junto con los correspondientes diagramas de difracción de electrones de las hidroxiapatitas sintetizadas utilizando los distintos carbones como plantilla. Estas imágenes indican la presencia en todos los casos de aglomerados de partículas aciculares independientemente del carbón utilizado como plantilla. Un estudio detallado en distintas zonas permite establecer un tamaño de partícula en promedio mayor para la muestra HA-C que para las apatitas sintetizadas empleando carbono mesoestructurado. Efectivamente, las partículas aciculares de HA-C presentan, en promedio, dimensiones de 150 × 30 nm mientras que para las demás, la dimensión larga es de entorno a 100 nm y la perpendicular oscila entre 10 y 20 nm. Por su parte, los diagramas de difracción de electrones muestran halos de difracción característicos de un material policristalino cuyos espaciados interplanares podrían corresponder a las reflexiones (002), (211), (321) y (004) de una fase tipo apatita.

La Figura II.3.33.1 muestra la imagen de TEM de la hidroxiapatita empleando carbón activado comercial como plantilla. La Figura II.3.33.2 muestra las imágenes de TEM a los mismos aumentos tanto de las hidroxiapatitas sintetizadas como de los correspondientes carbones mesoporosos ordenados empleados como plantilla, con el fin de comparar ambas estructuras. Se observa que las hidroxiapatitas sintetizadas muestran un tamaño de partícula mucho menor en comparación con la de los distintos carbones. Por lo tanto, parece que no se trata de un proceso directo de replicado tal y como se había propuesto en el esquema inicial (Figura II.2.7).

En algunas partículas, se observan zonas más claras en el interior de estas partículas aciculares que podrían indicar la presencia de poros desordenados originados tras la combustión del carbón [410]. Sin embargo, se postula que lo más probable es que se correspondan con artefactos originados por el haz de electrones al incidir sobre las muestras [468].

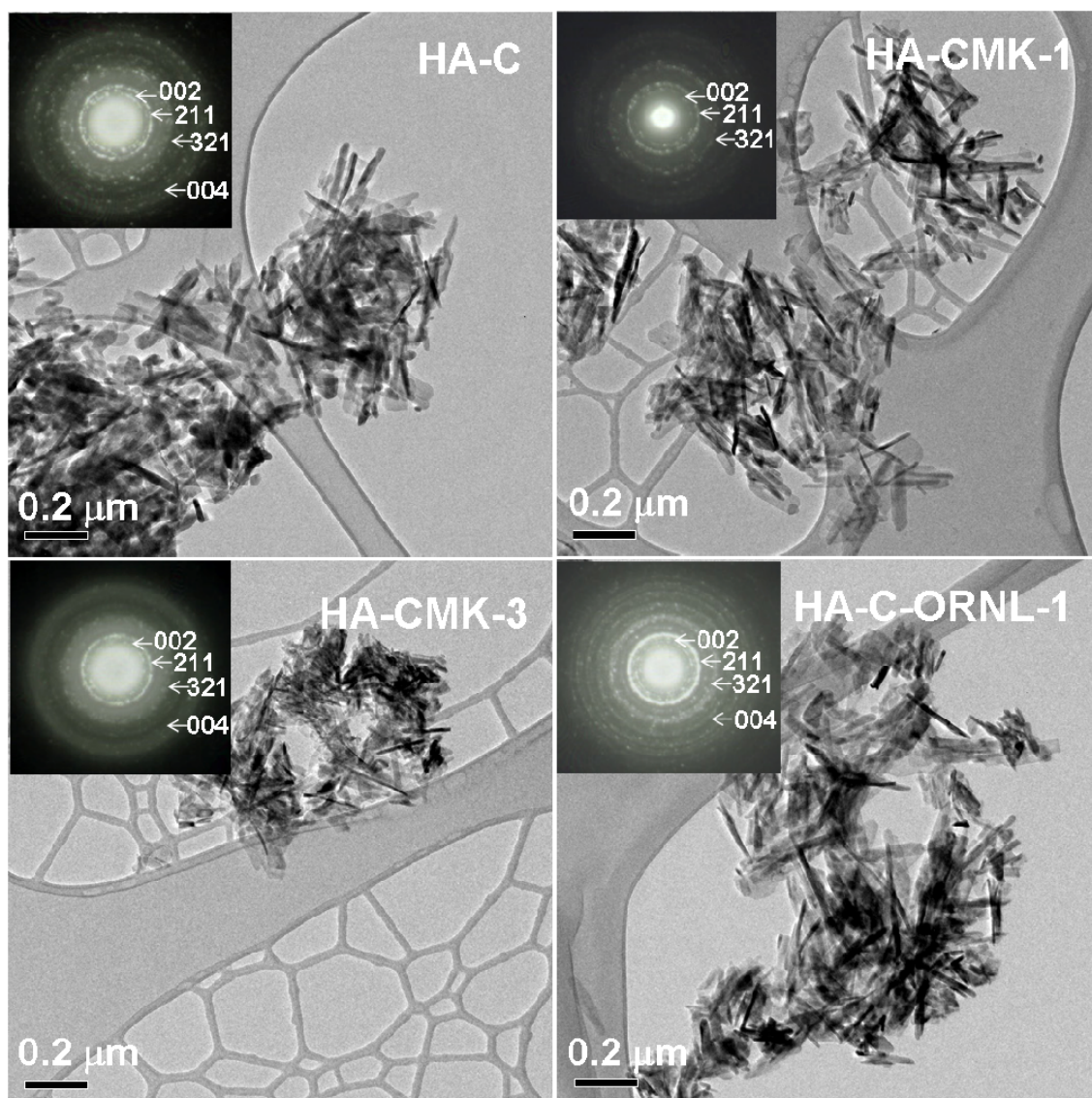


Figura II.3.32. Imágenes de TEM y diagramas de difracción de electrones de las muestras de hidroxiapatita calcinada utilizando los diferentes carbonos como plantilla.

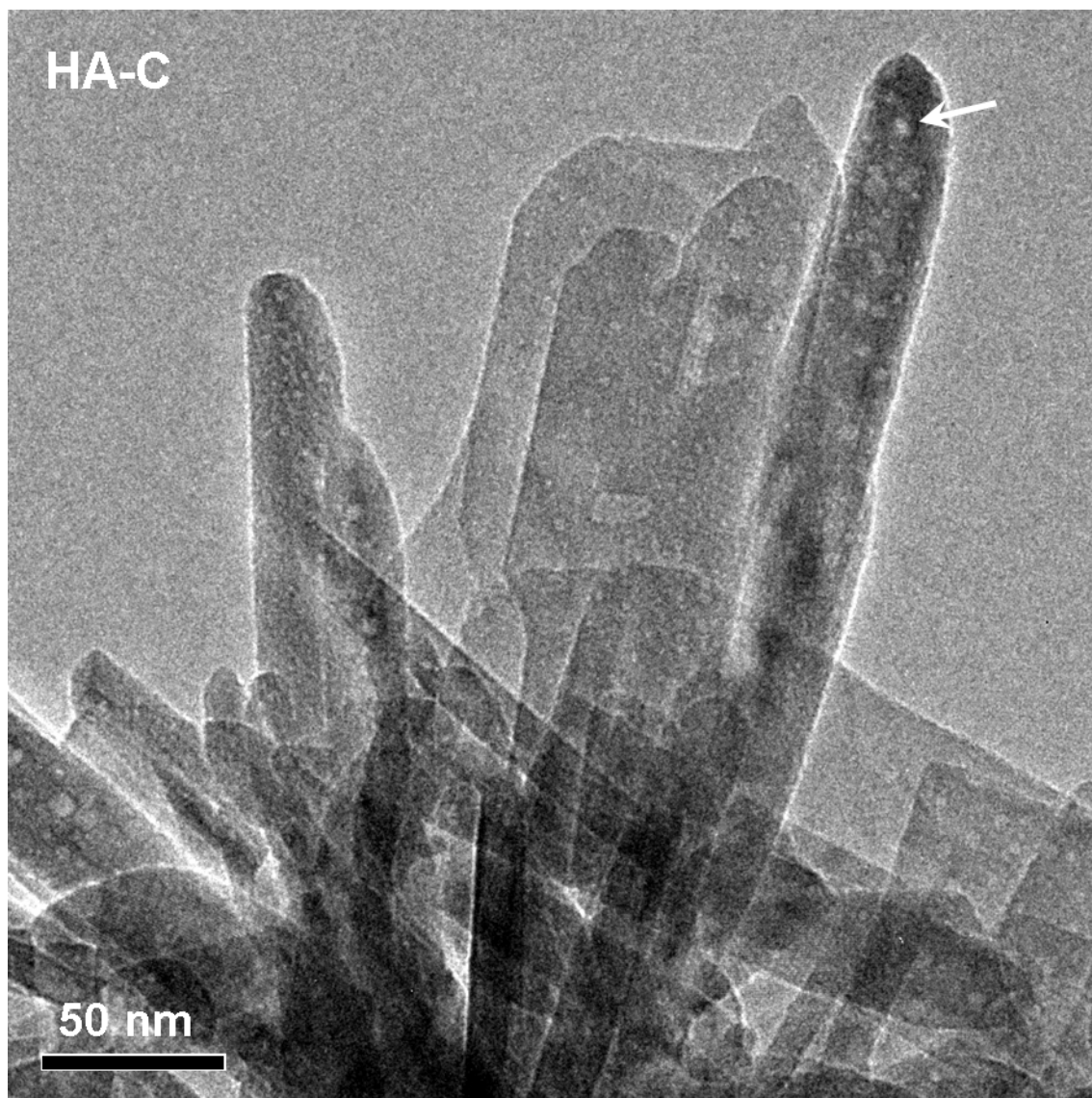


Figura II.3.33.1. Imagen de TEM de la muestra de hidroxiapatita calcinada obtenida empleando carbón activado durante la síntesis. Marcado con una flecha se observa un artefacto creado por el haz de electrones.

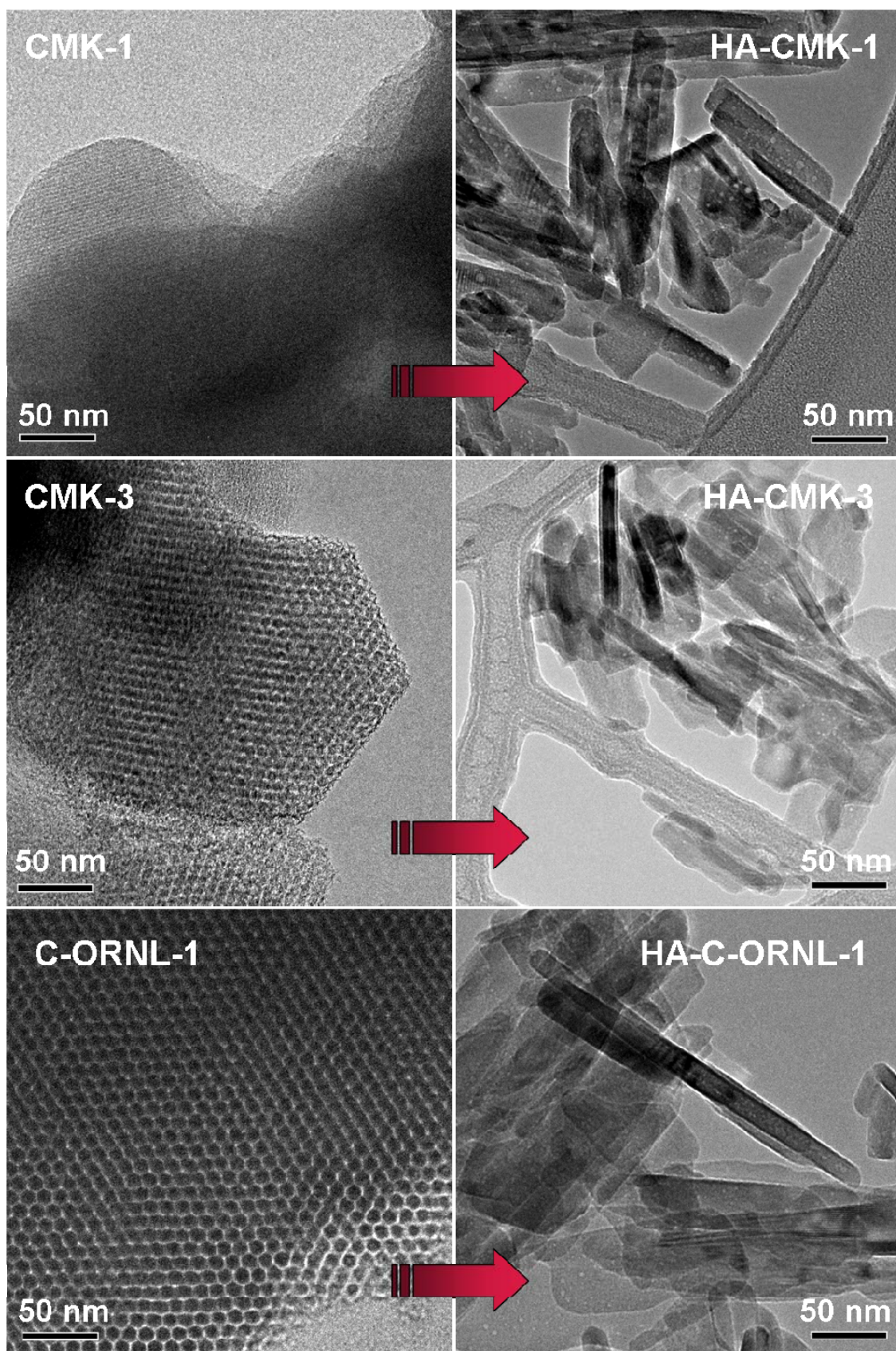


Figura II.3.33.2. Imágenes de TEM de los diferentes carbones mesoporosos ordenados empleados como plantilla (izquierda) y de las correspondientes muestras de hidroxapatita calcinadas (derecha).

Asimismo, algunas imágenes muestran periodicidades que desaparecen completamente al cambiar las condiciones de enfoque y que tan sólo se observan cuando existe superposición de partículas, tal y como muestra la Figura II.3.34. Se trata pues de artefactos denominados *patrones de Moiré*, que suelen aparecer bien debido a la superposición de cristales de hidroxiapatita con diferentes orientaciones o bien como consecuencia del daño producido por el haz de electrones, tal y como han demostrado estudios previos [469,470].

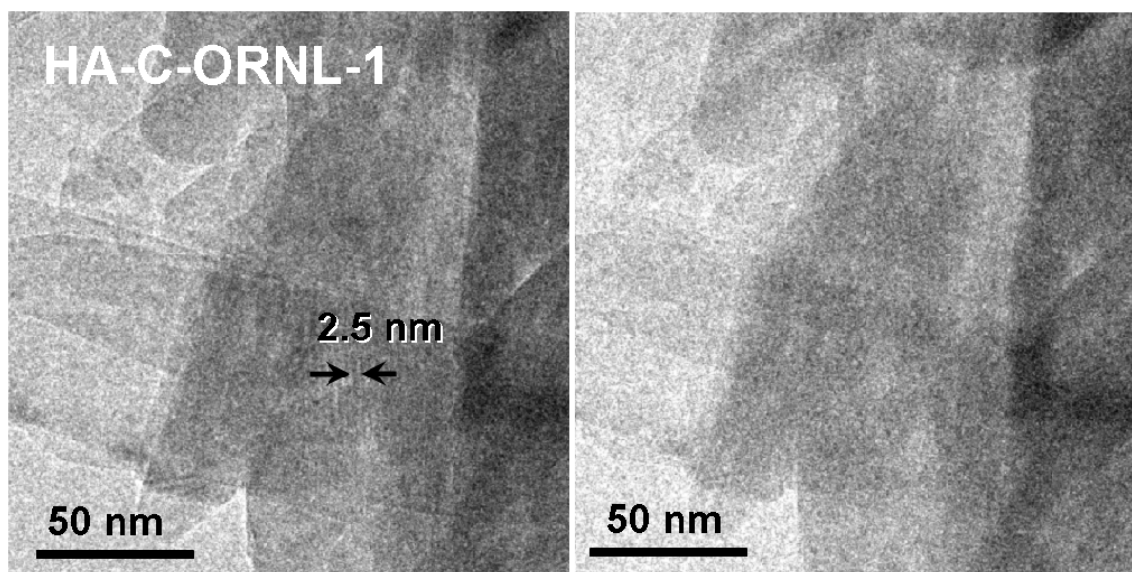


Figura II.3.34. Imágenes de TEM de la muestra HA-C-ORNL-1 en diferentes condiciones de foco. Los *patrones de Moiré* observados (izquierda) desaparecen al cambiar el foco (derecha).

El estudio mediante microscopía de alta resolución confirma la presencia de hidroxiapatita. La Figura II.3.35 muestra la imagen de TEM de la muestra HA-CMK-1 a mayores aumentos. Se pueden distinguir dos dominios, nombrados como A y B, pertenecientes a dos cristales diferentes en los que las periodicidades observadas correspondientes a los ejes de zona $[0-11]$ y $[0-10]$ están de acuerdo con las de la hidroxiapatita, tal y como confirman las transformadas de Fourier correspondientes.

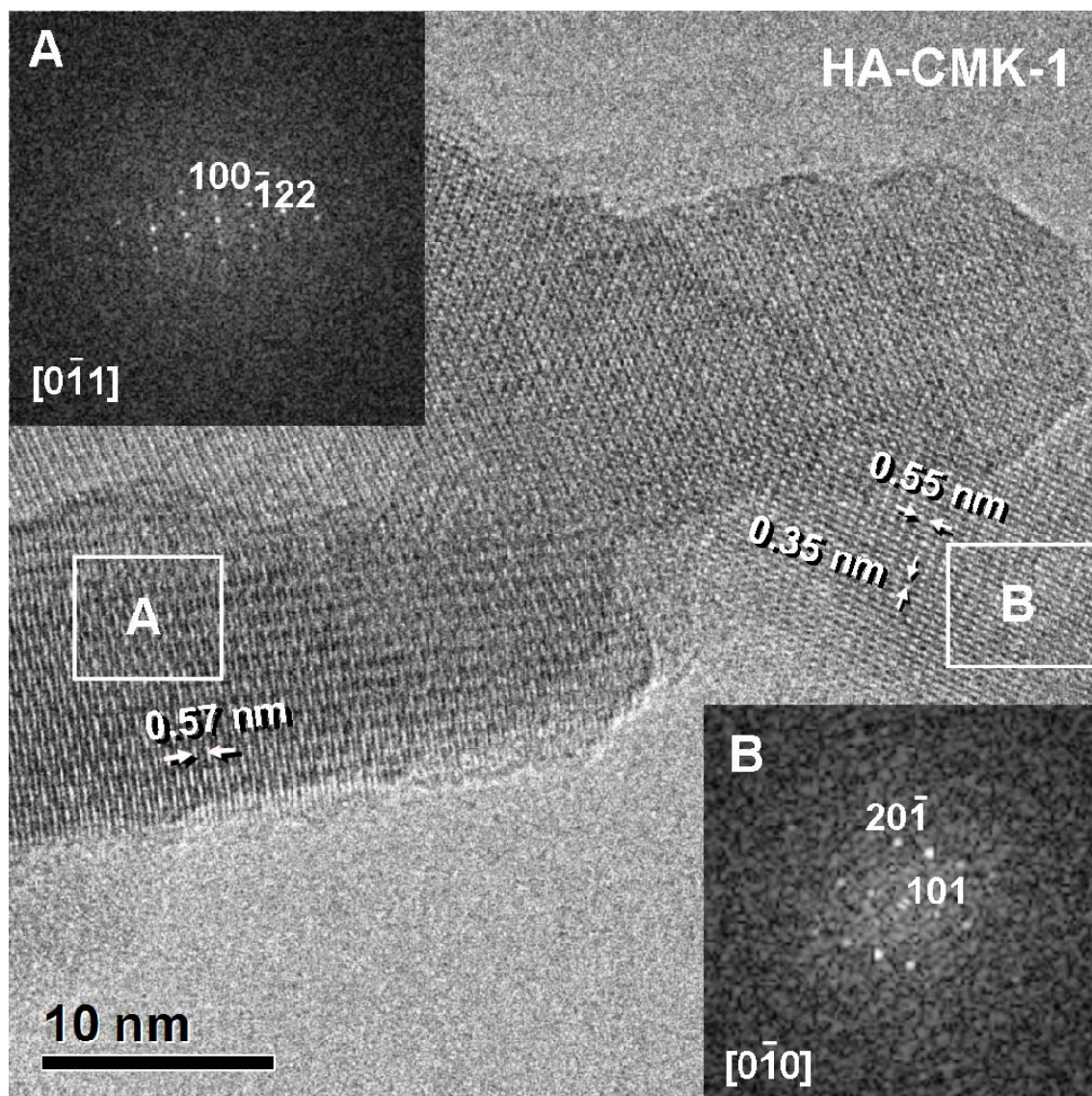


Figura II.3.35. Imagen de TEM de alta resolución de la muestra HA-CMK-1 y su correspondiente transformada de Fourier en distintas zonas.

En la Figura II.3.36.1 se muestran imágenes de alta resolución características de las hidroxiapatitas obtenidas empleando plantillas de carbón mesoporoso ordenado durante la síntesis. Es bastante frecuente observar la superposición de partículas. Así se han observado dos situaciones: (i) partículas aciculares embebidas o superpuestas sobre partículas más grandes e irregulares (véase Figura II.3.36.1, HA-CMK-1 y HA-CMK-3) y (ii) partículas aciculares de dimensiones de alrededor de $10 \times 100\text{ nm}$ con partículas adyacentes, con cierto grado de solapamiento (véase Figura II.3.36.1, HA-C-ORN-1).

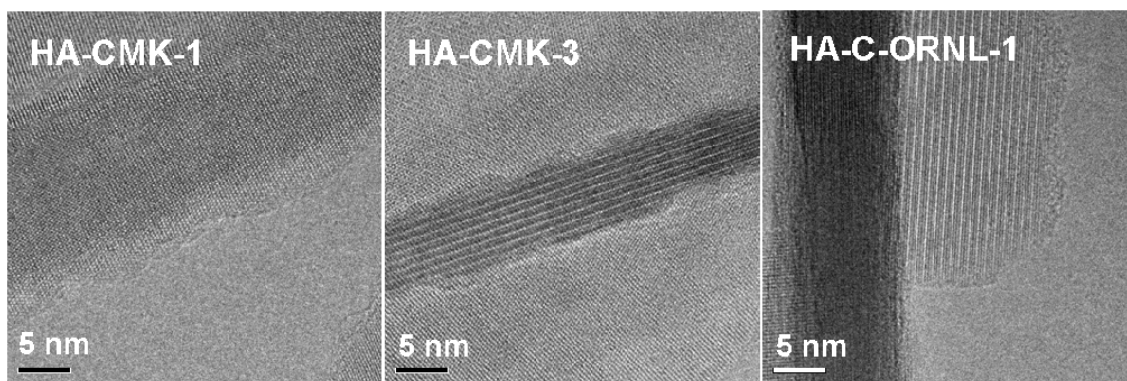


Figura II.3.36.1. Imágenes de TEM de alta resolución de las muestras de hidroxiapatita sintetizadas empleando distintos carbones como plantilla HA-CMK-1, HA-CMK-3 y HA-C-ORNL-1.

Las Figuras II.3.36.2, II.3.36.3 y II.3.36.4 muestran con mayor grado de detalle, las imágenes de alta resolución características de las muestras HA-CMK-1, HA-CMK-3 y HA-C-ORNL-1, respectivamente. Las periodicidades observadas están de acuerdo con las distancias interplanares características de la hidroxiapatita a lo largo de las direcciones señaladas, como además confirman las transformadas de Fourier correspondientes. En las Figuras II.3.36.2 y II.3.36.3 se observan distintos dominios, denominados como A y B en los que la distinta orientación de los cristales hace que difracten diferentes familias de planos, todos ellos correspondientes a hidroxiapatita. En el caso de la muestra HA-C-ORNL-1 de la Figura II.3.36.4, la resolución obtenida sólo permite distinguir la distancia interplanar correspondiente de 0.8 nm a lo largo de la dirección (100) , característica de la hidroxiapatita.

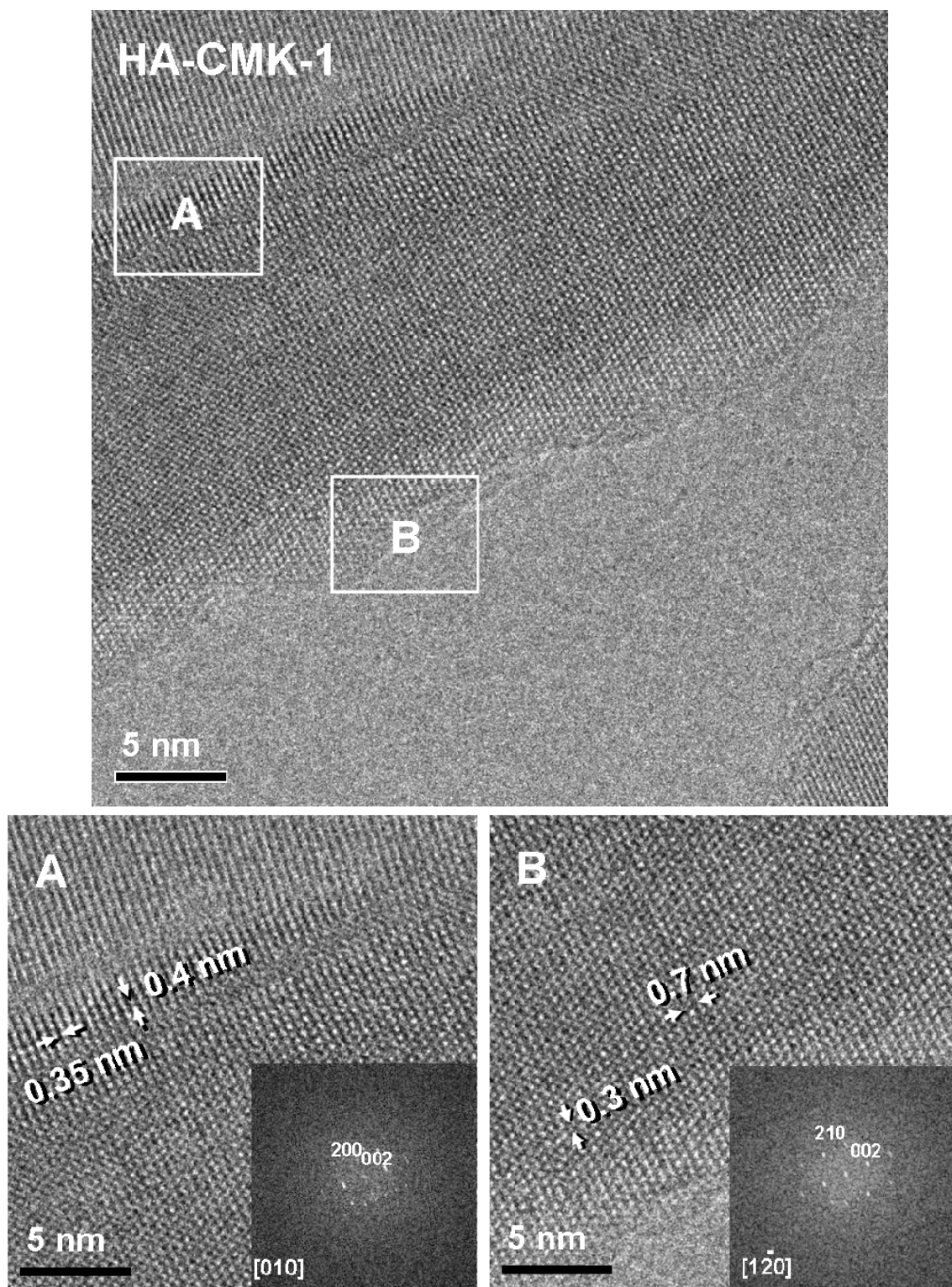


Figura II.3.36.2. Imagen de TEM de la muestra HA-CMK-1 en la que se observan dos dominios A y B. Se identifican espaciados interplanares que stán de acuerdo con los correspondientes a hidroxiapatita. Se incluyen las correspondientes transformadas de Fourier.

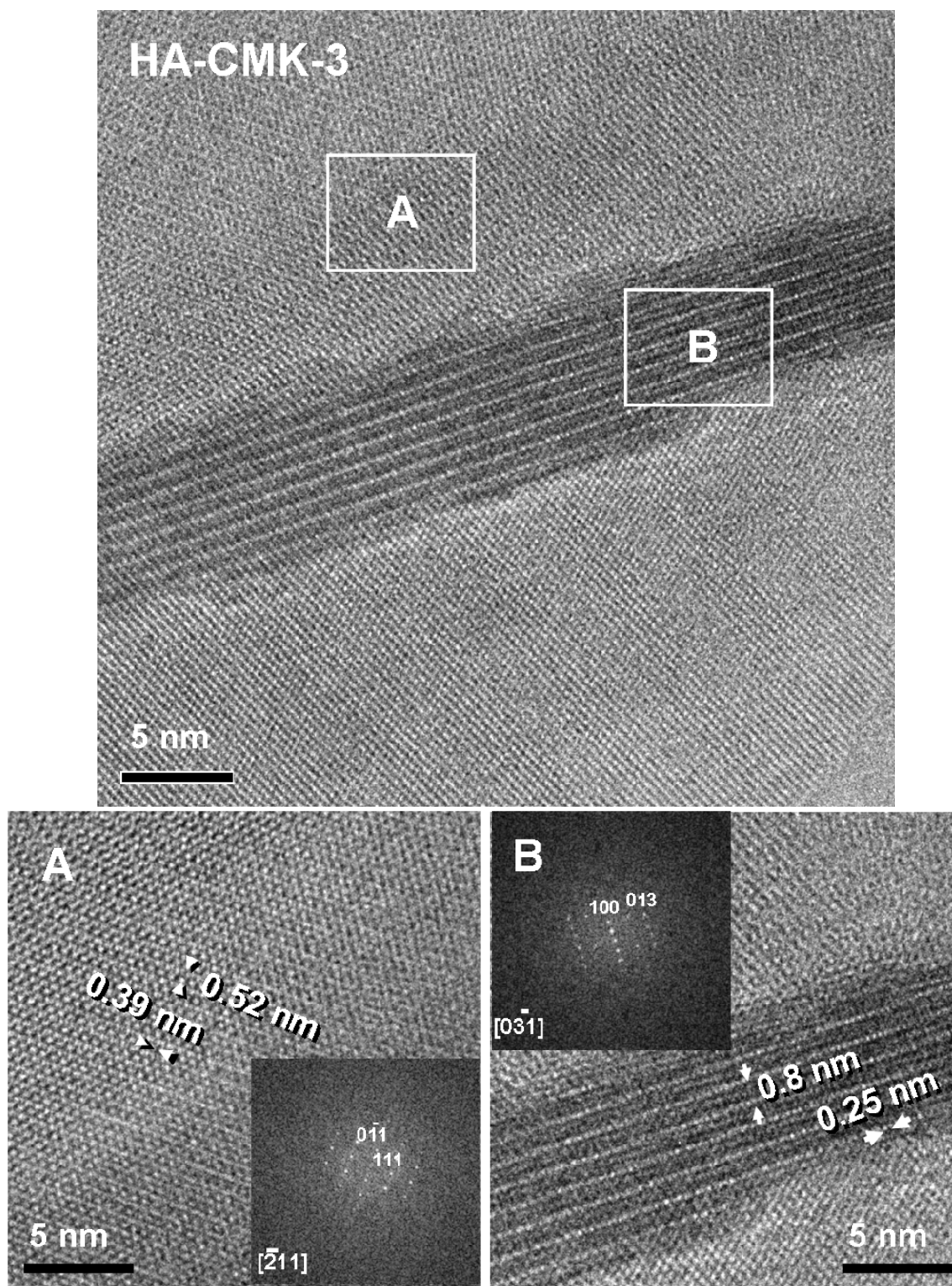


Figura II.3.36.3. Imagen de TEM de la muestra HA-CMK-3 en la que se observan dos dominios A y B. Se incluyen las correspondientes transformadas de Fourier.

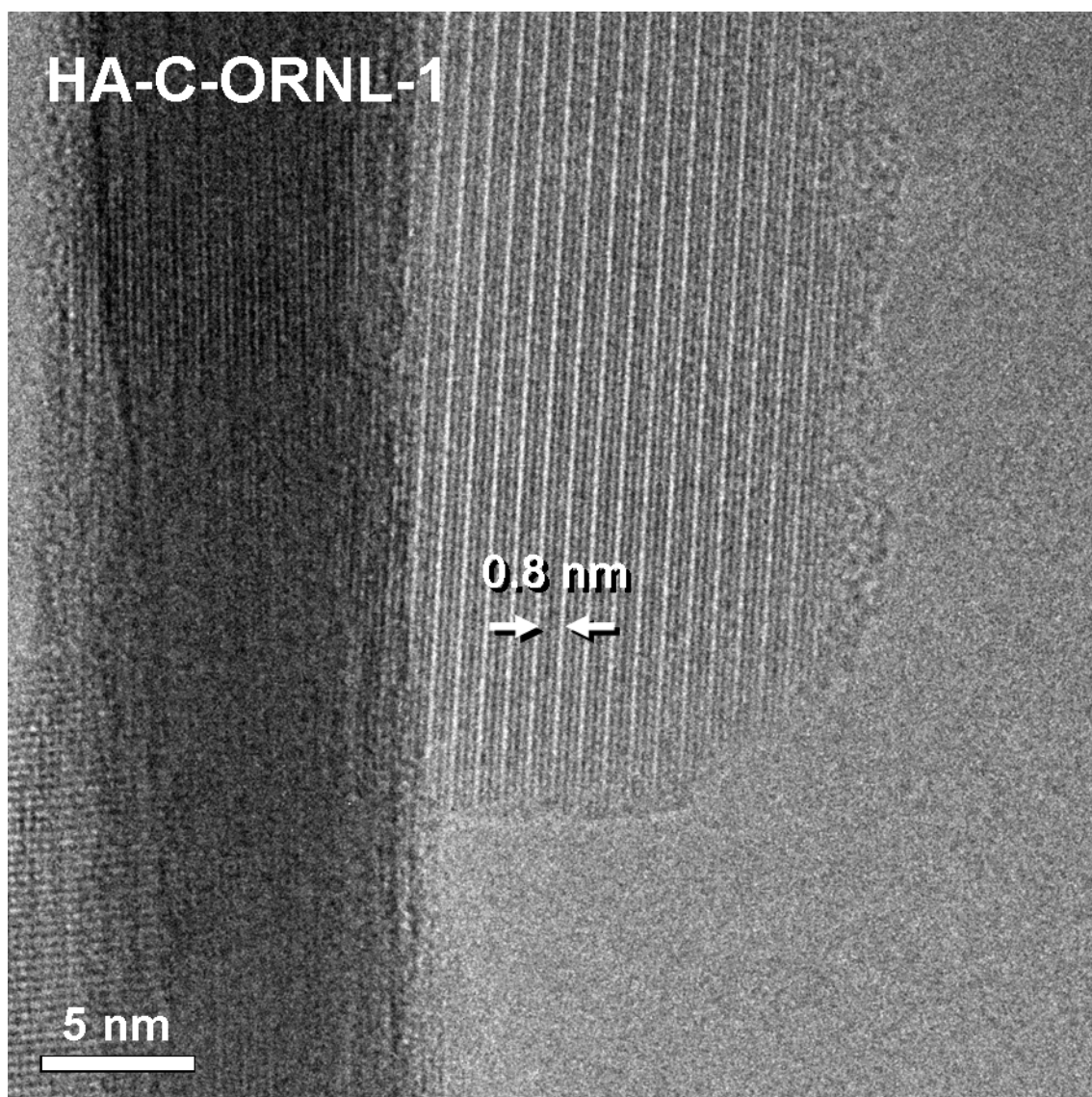


Figura II.3.36.4. Imagen de TEM de alta resolución de la muestra HA-C-ORNL-1.

Los resultados observados por TEM podrían explicar el mayor valor de S_{BET} y V_{T} para el caso de las muestras sintetizadas empleando plantillas de carbón. El menor tamaño de partícula observado por TEM para las muestras HA-CMK-3, HA-CMK-1 y HA-C-ORNL-1 concuerda con sus mayores parámetros texturales, confirmando el hecho de que estos parámetros texturales se refieren a la adsorción interparticular en los agregados de partículas.

Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, las hidroxiapatitas sintetizadas no pueden considerarse en ningún caso el negativo de las plantillas de carbono. En el esquema propuesto, se esperaría que durante el proceso de síntesis algunas partículas de hidroxiapatita hubieran precipitado empleando como molde la plantilla mesoporosa de

carbono ordenado. Sin embargo, es bien sabido que en todo proceso de nanomoldeo, la correcta impregnación de la plantilla es un aspecto clave para conseguir un material bien ordenado. Se piensa que los resultados obtenidos pudieran deberse al hecho de que la cantidad de carbono perteneciente a la plantilla es mucho menor que el sólido de hidroxiapatita resultante postulándose que una mayor cantidad de componente inorgánico (Ca y P) y velocidades rápidas de reacción favorecen la precipitación de la hidroxiapatita en el exterior de la plantilla de carbón [410], en detrimento de su precipitación en el interior de los poros de la plantilla de carbón. En efecto, se ha realizado un estudio por análisis termogravimétrico y análisis químico elemental C, H, N para calcular el porcentaje de materia orgánica perteneciente a la plantilla de carbono frente al correspondiente al sólido inorgánico de hidroxiapatita resultante, tal y como se describe a continuación.

La Figura II.3.37 representa los termogramas obtenidos para las muestras HA calcinada y la muestra HA-CMK-3 antes y después de la calcinación. La pérdida de peso registrada entre 200 °C y 600 °C para la muestra HA-CMK-3 sin calcinar se debe a la combustión de la materia orgánica, principalmente procedente de la plantilla de carbón, estimada en un 10 % en peso. Además, después del tratamiento de calcinación, los perfiles de las muestras HA y HA-CMK-3, sintetizadas en ausencia y en presencia de carbón respectivamente, son similares, corroborando así que el tratamiento térmico ha conseguido eliminar toda la plantilla de carbón. Por otro lado, el contenido en carbono obtenido a partir de microanálisis elemental de las de hidroxiapatita antes y después de la calcinación se muestra en la Tabla II.3.8.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por termogravimetría y corroboran la completa eliminación de la plantilla de carbón tras la calcinación. Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que existe cerca de un 90 % de sólido inorgánico frente a un 10 % de carbono procedente de la plantilla. Así pues, investigaciones futuras estarán dirigidas a la síntesis de estos materiales teniendo en cuenta estos parámetros, con el objetivo de obtener hidroxiapatita porosa.

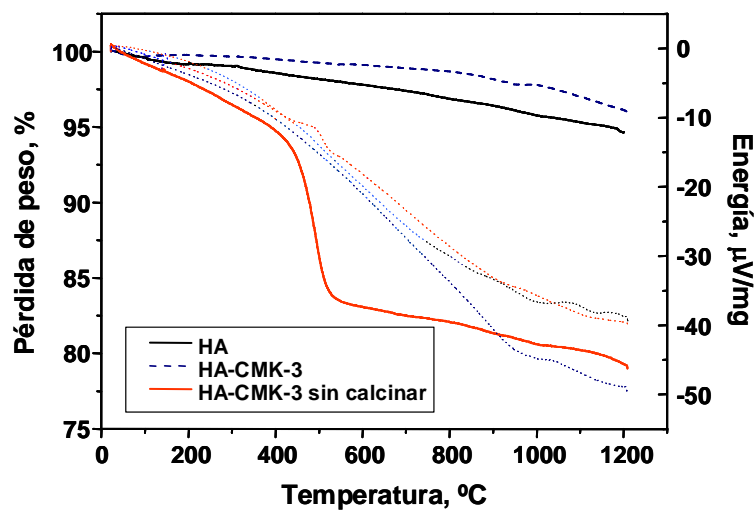


Figura II.3.37. Análisis termogravimétrico de las muestras de hidroxiapatita HA calcinada e hidroxiapatita HA-CMK-3 antes y después de la calcinación a 600 °C.

Tabla II.3.8. Análisis elemental de C, H, N de las muestras de hidroxiapatitas antes y después de la calcinación.

	Muestra	%C	%H	%N
Sin calcinar	HA	—	—	—
	HA-C	10.86	1.01	0.26
	HA-CMK-1	10.77	0.93	0.20
	HA-CMK-3	10.84	0.85	0.28
	HA-C-ORNL-1	8.31	0.84	0.15
Calcinada a 600 °C	HA	0.08	0.36	0.08
	HA-C	0.11	0.32	0.08
	HA-CMK-1	0.13	0.38	0.06
	HA-CMK-3	0.11	0.52	0.07
	HA-C-ORNL-1	0.09	0.39	0.08

II.4.- CONCLUSIONES

El conjunto de los resultados obtenidos en la parte II de la presente tesis permite extraer las siguientes conclusiones:

1. Se han sintetizado materiales mesoporosos ordenados de carbón **CMK-1** y **CMK-3** mediante el proceso de nanomoldeo a partir de materiales mesoporosos ordenados de sílice **MCM-48** y **SBA-15** utilizados como plantillas “duras”, respectivamente y sacarosa como fuente de carbono. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que:
 - La adecuada impregnación de la plantilla de sílice con el precursor de carbón es un factor clave para obtener una estructura porosa ordenada.
 - La pared de carbono de los materiales sintetizados es de naturaleza amorfa, compuesta por grafito desordenado en el que las láminas de grafeno están orientadas de manera aleatoria.
 - Las partículas de los materiales de carbón conservan la morfología característica de las partículas de los materiales de sílice empleados como plantilla.
 - Los parámetros texturales y estructurales de los carbones obtenidos están relacionados con la estructura porosa de las plantillas de sílice correspondientes. El carbón CMK-3 se obtiene como réplica inversa de la sílice de partida mientras que la síntesis del carbón CMK-1 no sigue un proceso directo de replicado.
2. Se ha sintetizado el material mesoporoso ordenado de carbón **C-ORNL-1** por el proceso de nanomoldeo a partir de plantillas “blandas” mediante el autoensamblaje cooperativo de resinas fenólicas, como precursores poliméricos de carbón, y el surfactante F127, como agente director de estructura, permitiendo eliminar la etapa de disolución de la plantilla de sílice.
3. El estudio de la microporosidad los carbones mesoporosos ordenados sintetizados mediante medidas de adsorción de nitrógeno, *n*-hexano y neohexano indica que estos materiales poseen una fracción de microporos, originados tras la etapa de carbonización.

4. La evaluación de la polaridad de la superficie de los materiales sintetizados:
 - Confirma la mayor hidrofiliidad de la sílice mesoporosa en comparación con el carbón mesoporoso, debido principalmente a la presencia de grupos hidroxilo en superficie.
 - Pone de manifiesto el carácter hidrófobo de la superficie de los carbones, si bien la superficie de la sílice funcionalizada por reacción post-síntesis con agentes sililantes portadores de grupos metilo adquiere un carácter hidrófobo aún más marcado en comparación con el carbón.
5. La modulación de la polaridad de las superficies de sílice y carbón permite expandir la capacidad de estos materiales mesoporosos ordenados como adsorbentes selectivos de biomoléculas, lo cual es interesante para sus futuras aplicaciones en biotecnología y biomedicina.
6. Se han empleado los carbones mesoporosos ordenados **CMK-1**, **CMK-3** y **CORN-1** como plantillas para la síntesis de fosfatos de calcio.
7. La combinación del método de síntesis de fosfatos de calcio por precipitación junto con el método de nanomoldeo con plantillas de carbón permite obtener fases de hidroxiapatita no estequiométrica deficiente en calcio de tamaño micrométrico.
8. La eliminación de la plantilla de carbón por combustión da lugar a partículas de hidroxiapatita de morfología acicular.
9. El empleo de diferentes plantillas de carbón mesoporoso ordenado da lugar a hidroxiapatita cristalina en todos los casos. Los resultados obtenidos muestran que:
 - La hidroxiapatita obtenida no puede considerarse una réplica inversa de la plantilla empleada.
 - El proceso de impregnación de la plantilla de carbón con los precursores de calcio y fósforo es una etapa clave en el proceso de nanomoldeo para la obtención hidroxiapatita porosa.

CONCLUSIONS

The results obtained in the part II of this thesis show the following conclusions:

1. Ordered mesoporous carbon materials **CMK-1** and **CMK-3** have been synthesized by the nanocasting strategy using ordered mesoporous silica materials MCM-48 and SBA-15 as hard templates, respectively, and sucrose as the carbon source. The obtained results highlight that:
 - In the nanocasting process, the impregnation of the silica template with the carbon precursor is the key step in order to obtain a fully ordered porous structure.
 - The carbon walls of the synthesized materials are amorphous, formed by disordered graphite where the graphene layers are randomly oriented.
 - As a consequence of the replication process, carbon material particles show the characteristic morphology of the silica materials used as template.
 - The textural and structural parameters of the synthesized carbons are related to the porous structure of the silica template. CMK-3 carbon is obtained as an inverse replica of SBA-15 whereas the synthesis of CMK-1 carbon does not follow a direct replication process.
2. Ordered mesoporous carbon C-ORNL-1 has been synthesized by the soft-templating nanocasting strategy. It has been obtained by the cooperative self-assembly of a phenolic resin, as polymeric carbon precursor, and the surfactant F127, as structure directing agent, thus making unnecessary the silica template removal step.
3. The study of the microporosity of the synthesized ordered mesoporous carbons by nitrogen, *n*-hexane and neohexane adsorption indicates these materials show a fraction of micropores, originated after carbonization.
4. Evaluation of the surface polarity of materials:
 - Confirms the greater hydrophilic character of mesoporous silica in comparison with mesoporous carbon, mainly due to the presence of surface hydroxyl groups.

- States the hydrophobic character of carbon surface, although the surface of methyl group grafted silica shows a more hydrophobic character in comparison with carbon.
5. Modulation of silica and carbon surface polarity extends the ability of these ordered mesoporous materials to act as selective biomolecule adsorbents, an interesting aspect in view of their future applications in biotechnology and biomedicine.
 6. Ordered mesoporous carbons **CMK-1**, **CMK-3** y **CORN-1** have been used as templates for the synthesis of calcium phosphates.
 7. The combination of the precipitation method for the synthesis of calcium phosphates together with the nanocasting strategy with carbon templates allows obtaining calcium deficient non stoichiometric hydroxyapatite of micrometric size.
 8. After removal of the carbon template by calcination needle-shaped hydroxyapatite particles are obtained.
 9. The use of different mesoporous carbon templates originates crystalline hydroxyapatite. This shows that:
 - The obtained hydroxyapatite can not be considered as an inverse replica of the carbon template.
 - The impregnation of the carbon template with the calcium and phosphate precursors seems to be a key step in the nanocasting process for the obtention of porous hydroxyapatite.



PARTE III. APÉNDICES

III.1. LISTA DE PUBLICACIONES

La presente tesis ha dado lugar a los siguientes trabajos de investigación:

- I A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regí. Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5, 3478-3487.
- II A. Nieto, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí. Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate alendronate dosage. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, 116 (1-3), 4-13.
- III A. Nieto, M. Colilla, F. Balas, M. Vallet-Regí. Surface electrochemistry of mesoporous silicas as key factor for the design of tailored delivery devices. *Langmuir*, 2010, 26 (7), 5038-5049.
- IV T.J. Kinnari, J. Esteban, E. Gómez-Barrena, N. Zamora, R. Fernández-Roblas, A. Nieto, J.C. Doadrio, A. López-Noriega, E. Ruiz-Hernández, D. Arcos, M. Vallet-Regí. Bacterial adherence to SiO₂ based multifunctional bioceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 89A, 215-223.
- V J.A. Puértolas, J.L. Vadillo, S. Sánchez-Salcedo, A. Nieto, E. Gómez-Barrena, M. Vallet-Regí. A novel Mullins effect behavior under compression in micelle-templated silica and micelle-templated silica/agarose systems. *Chemical Engineering Journal*, 2010, enviado.

Otras publicaciones relacionadas

- S. Sánchez-Salcedo, A. Nieto, M. Vallet-Regí. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 2008, 137, 62-71.
- M. Alcaide, M.C. Serrano, R. Pagani, S. Sánchez-Salcedo, A. Nieto, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés. L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite- β TCP/agarose biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 89A, 539-549.
- J.A. Puértolas, J.L. Vadillo, S. Sánchez-Salcedo, A. Nieto, E. Gómez-Barrena, M. Vallet-Regí. Compression behaviour of biphasic calcium phosphate and biphasic calcium phosphate/agarose scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2010, enviado.

III.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Actualmente, las estrategias para el desarrollo de cerámicas para aplicaciones en la regeneración de tejido óseo se centran en el control de la composición química, la porosidad así como en la incorporación de agentes que favorezcan la osteogénesis. De igual manera, la obtención de estructuras de porosidad jerárquica diseñada combinando porosidad en la meso y macro escala mediante técnicas de prototipado, abre camino para el diseño de una nueva generación de biocerámicas capaces de actuar como soportes en defectos óseos y favorecer la regeneración de dicho tejido. Así pues, los materiales mesoporosos ordenados de sílice podrían ser aplicados en un futuro como materiales de partida para la fabricación de estructuras porosas para regeneración tisular. El conocimiento adquirido en cuanto a la interacción biomolécula-matriz permitiría funcionalizar la supeficie de tales estructuras con moléculas que actúen como señales capaces de atraer las células implicadas en los procesos de formación de hueso. Por otra parte, el futuro en cuanto al desarrollo de nuevas técnicas y procedimientos de síntesis para la obtención de biomateriales de última generación persigue objetivos ambiciosos tales como la incorporación de la ingeniería genética a los biomateriales o el desarrollo de nuevos sistemas nanotecnológicos para la curación de enfermedades.

Por otro lado, se sabe que tanto la capacidad de los materiales mesoporosos ordenados de carbono para adsorber biomoléculas tales como proteínas o enzimas, como la posibilidad de controlar los parámetros texturales y la polaridad de la superficie de estos materiales, permite ampliar sus aplicaciones en biomedicina y biotecnología. Además, estos materiales presentan una estabilidad térmica y mecánica en medio acuoso superiores a las de la sílice y demuestran una mayor capacidad para la adsorción de sustancias hidrofóbicas. Así, la separación cromatográfica de mezclas de proteínas, la eliminación de contaminantes en aguas, el desarrollo de sistemas extracorpóreos de filtración para hemodiálisis, o la liberación de fármacos son algunas de las posibles aplicaciones de dichos materiales. Por ello, futuras investigaciones se dirigen hacia el estudio de la capacidad de estos materiales de carbón para la adsorción de biomoléculas.

En lo que respecta a la síntesis de hidroxiapatita de porosidad ordenada mediante el proceso de nanomoldeo a partir de plantillas de carbón mesoporoso ordenado, los estudios preliminares obtenidos en esta tesis abren el camino para continuar explorando

las posibilidades de esta ruta de síntesis. Se postula que la optimización del proceso de impregnación a través del control de la relación entre la cantidad carbón empleado como plantilla y la cantidad de fase inorgánica obtenida por precipitación, permitirá eventualmente obtener hidroxiapatita poroosa con un cierto grado de orden estructural. Además, el estudio de adsorción de biomoléculas permitirá expandir las aplicaciones biomédicas de los materiales obtenidos. Así pues, las futuras investigaciones se orientarán en esta dirección.

III. 3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

III.3.1. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial (TGA/DTA)

El TGA da una medida cuantitativa de la ganancia o pérdida de peso de un material en función de la temperatura, y se puede llevar a cabo en distintas atmósferas de trabajo. El DTA mide cambios de energía, es decir, si un proceso es endotérmico o exotérmico con respecto a una muestra de referencia. Los análisis TGA/DTA de la parte I de la presente tesis se han realizado en un equipo Perkin-Elmer Diamond entre 30 y 900 °C en un flujo constante de aire de 100 ml/min con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. Las determinaciones se efectuaron en crisoles de platino. Los análisis térmicos y termogravimétricos de la parte II de la presente tesis se han llevado a cabo en un equipo NETZSCH STA449C Jupiter en un flujo constante de aire sintético de 100 ml/min entre 40 °C y 1000 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min o bien en un flujo constante de argón de 100 ml/min entre 40 y 400 °C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min. Las determinaciones se efectuaron en crisoles de alúmina. El dispositivo experimental empleado en los estudios de adsorción de agua para determinar la hidrofobicidad de los materiales [471,472] se muestra en la Figura III.1. Se burbujea una corriente de argón a través de agua a 25 °C antes de que el gas alcance la cámara de medida y el experimento comienza una vez que el peso de la muestra se ha equilibrado.

III.3.2. Microanálisis elemental de C, H, N

La determinación del contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las muestras se ha llevado a cabo en un equipo LECO CHNS-932.

El análisis se lleva a cabo mediante la combustión de la muestra en oxígeno y los gases resultantes (CO₂, H₂O y N₂) se llevan a unas condiciones dadas de presión, temperatura y volumen. Los productos gaseosos se separan mediante una columna cromatográfica y se miden como función de la conductividad térmica. Tras la calibración del aparato con muestras conocidas, la cuantificación se realiza en porcentaje en peso, empleando una técnica termogravimétrica.

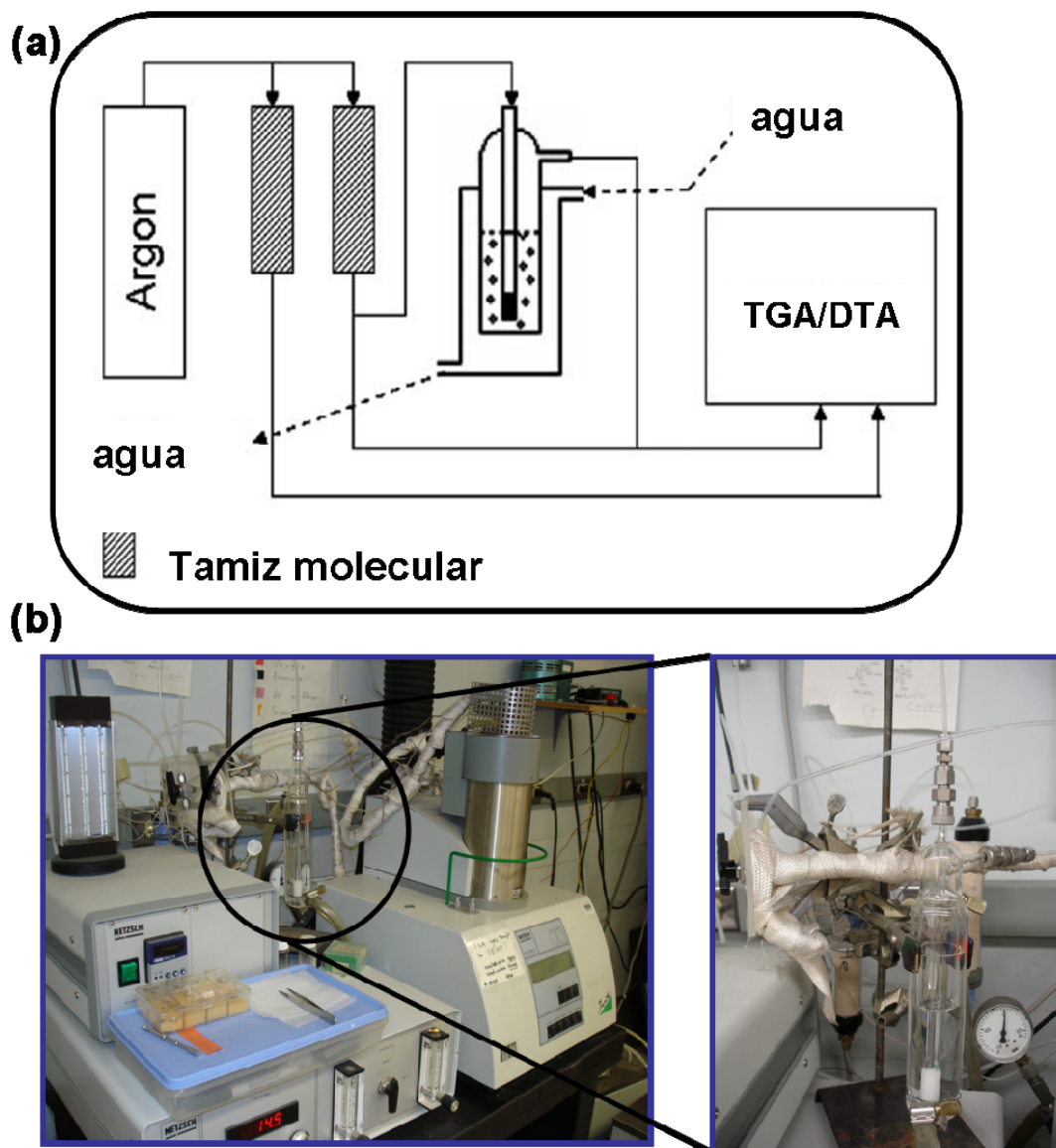


Figura III.1. (a) Diagrama explicativo y (b) imágenes del montaje experimental empleado para los experimentos de desorción de agua por termogravimetría en los materiales de sílice y de carbón sintetizados. Adaptado de la referencia [471].

III.3.3. Difracción de rayos X (XRD)

Los patrones de XRD para la caracterización estructural de los materiales se han obtenido utilizando un difractómetro Philips X'Pert Plus con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, 40 kV) en el rango de 0.6° a 10.0° (2θ) con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo de análisis de 5 s. Los análisis en el rango 20.0° a 50.0° (2θ) se han llevado a cabo con un paso de 0.04° (2θ) y un tiempo de análisis de 1 s. Las medidas de difracción correspondientes a las muestras de fosfatos de calcio se han llevado a cabo en el rango de 4.0° a 120.0° (2θ) con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo de análisis de 10 s.

III.3.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier se han registrado entre 400 y 4000 cm^{-1} en un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus 470 en el modo de transmisión empleando el método de la pastilla de KBr.

III.3.5. Espectroscopía Raman

Mientras que la espectroscopía FTIR detecta cambios en el momento dipolar de las moléculas, la espectroscopía Raman detecta cambios en la polarizabilidad eléctrica, siendo pues técnicas complementarias. Así, los enlaces que conectan dos partes idénticas o casi idénticas en una molécula tienden a ser más activos en Raman que en espectroscopía infrarroja. Este es precisamente el caso de las bandas de absorción asociadas con los enlaces C=C en los materiales de carbón.

Los espectros Raman se han adquirido en un espectrómetro Renishaw M1000 Micro Raman equipado con una fuente de excitación basada en la línea de 514.4 nm de un láser de Ar^+ . Los espectros se han registrado a temperatura ambiente en atmósfera de aire utilizando una potencia láser de 0.5 W.

III.3.6. Espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF)

La determinación del contenido de Ca y P en las muestras sólidas se ha llevado a cabo mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X en un espectrofotómetro Philips PANalytical Axios, que emplea como fuente de rayos X un cátodo de rodio, utilizándose la radiación de la línea RhK_α ($\lambda = 0.6139 \text{ \AA}$). Este equipo emplea dos cristales monocromadores, uno de LiF y otro de wolframio, que discriminan la señal de rayos X emitida por la muestra en función de su energía. El análisis se limita a los elementos cuyo número atómico, Z, sea mayor a 6 (a partir del boro).

Las muestras se comprimieron en forma de discos de 13 mm de diámetro mediante una presión uniaxial de 0.5 MPa y se depositaron sobre un lecho de ácido bórico. Para la medida se han empleado portamuestras de aluminio con máscaras de 10 mm de diámetro.

III.3.7. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX)

El espectro de rayos X emitido por un material bajo el impacto de un haz de electrones focalizado, contiene información relativa a la composición del sólido. Una parte de los electrones incidentes excita los átomos de la muestra, los cuales emiten sus radiaciones características, que son recogidas y analizadas por el espectrómetro de rayos X. El resto de los electrones son retrodispersados por la muestra sin pérdida apreciable de energía. La retrodispersión es proporcional al número atómico, siendo menor para los elementos cuyo número atómico es menor. La variación de la fracción del número atómico se utiliza para determinar la variación de la composición de la muestra.

Dado que la intensidad de la radiación de fondo es muy elevada como consecuencia de la excitación directa, conviene emplear siempre que sea posible, líneas de emisión L o M en lugar de líneas K, porque aquellas se sitúan en el espectro de radiaciones emitidas más alejadas del máximo de intensidad del espectro continuo. El espectro se analiza mediante discriminación de los fotones que penetran en el detector en función de su energía, evaluándose los elementos a cuantificar por su energía característica.

Los análisis se han realizado en un sistema *Oxford Pentafet* acoplado a un microscopio de transmisión JEOL 3000 FEG. El análisis se limita a los elementos cuyo número atómico, Z , sea mayor que 12 (a partir del sodio), aunque existen ciertos tipos de ventanas de detección especiales (ATW) que permiten determinar la concentración de elementos ligeros (a partir del boro). Para una determinación cuantitativa es necesario aplicar correcciones de fluorescencia, absorción, y eficiencia de detección así como una comparación con estándares conocidos.

III.3.8. Resonancia magnética nuclear de ^{29}Si y ^{13}C (NMR)

El fenómeno de la resonancia magnética nuclear se basa en la interacción de los momentos magnéticos de los núcleos con un campo magnético externo, lo que produce la separación de los niveles de energía asociados a las diferentes orientaciones de los momentos magnéticos respecto al campo magnético. La variación de la frecuencia de resonancia del núcleo, debida al apantallamiento por los electrones que lo rodean, se conoce como desplazamiento químico y es característica del entorno químico del núcleo.

La aplicación de la caracterización por NMR en materiales mesoporosos ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas NMR de sólidos, rotación de ángulo mágico (MAS-NMR) y polarización cruzada (CP-NMR). MAS-NMR permite reducir al mínimo la anchura de las bandas del espectro debida a las interacciones dipolares y cuadrupolares y a las anisotropías asociadas al desplazamiento químico (variación de la posición de la línea con la orientación del cristal). Consiste en la rotación rápida de la muestra entorno a un eje inclinado con un ángulo de $54^{\circ}44'$ respecto a la dirección del campo magnético externo. La técnica CP-NMR mejora la relación señal/ruido del espectro de núcleos con abundancia natural baja sin afectar a la resolución del espectro.

La espectroscopía ^{29}Si NMR proporciona información estructural de los materiales y permite determinar la proporción de unidades organosiloxano así como la relación de especies condensadas y no condensadas. Los centros silíceos tetrafuncionales se han nombrado con la notación convencional Q^n donde Q se refiere a las especies siloxano $[\text{Si}(\text{OSi})_n(\text{OH})_{4-n}]$, siendo $n = 2-4$ el número de átomos de oxígeno puente que rodean al átomo de silicio central. Las unidades estructurales Q^4 representan tetraedros SiO_4 interconectados que forman parte de las paredes de sílice. Las unidades Q^3 están asociadas con grupos Si-OH aislados tanto libres como unidos por enlace de hidrógeno. Las unidades Q^2 corresponden a grupos silanol geminales. Los espectros de resonancia magnética de estado sólido de ^{29}Si permiten analizar el entorno químico de los átomos de silicio así como el grado de funcionalización alcanzado [473]. La técnica de polarización cruzada ^{29}Si CP MAS NMR aumenta la sensibilidad en la detección de los átomos de silicio próximos a protones y puede emplearse para estimar de manera cuantitativa los grupos Si-OH en superficie. Es posible monitorizar los cambios relativos en la concentración de los grupos funcionales en función del tiempo de contacto adquiriendo cada espectro de polarización cruzada bajo condiciones idénticas. Sin embargo, para asegurar una determinación cuantitativa totalmente fiable, la dinámica de relajación en la polarización cruzada se ha de examinar previamente. Por ello, para obtener información cuantitativa a partir de espectros CP mediante deconvolución de la región espectral Q de los espectros experimentales en bandas gaussianas individuales Q^4 , Q^3 , y Q^2 , es preciso controlar el tiempo de contacto durante el que se transfiere polarización del núcleo ^1H al núcleo ^{29}Si y llevar a cabo todos los espectros en las mismas condiciones.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^{29}Si se realizaron en un espectrómetro Bruker AV-400-WB a 79.49 MHz combinando las técnicas de polarización cruzada (CP) y rotación de ángulo mágico (MAS). Se utilizaron rotores de ZrO_2 de 4 mm de diámetro. Para referir los desplazamientos químicos de ^{29}Si se utilizó como patrón DSS (sal sódica del ácido 2,2-dimetil-2-silapenta-5-sulfónico) a $\delta = 0.0$ ppm. Los espectros se registraron con una anchura de pulso de 4.5 μs , un tiempo de contacto de 3.5 ms y un tiempo de relajación de 5 s. La velocidad de giro fue de 10 KHz.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker 200 NMR a 75.45 MHz mediante la técnica de polarización cruzada. Se han utilizado rotores de ZrO_2 de 7 mm de diámetro. Para referir los desplazamientos químicos de ^{13}C se ha utilizado como patrón el grupo C=O de la glicina a $\delta = 176.1$ ppm. Los espectros se registraron con una anchura de pulso de 4 μs , un tiempo de contacto de 2.5 ms y un tiempo de relajación de 3 s. La velocidad de giro fue de 4 kHz

La cantidad de grupos silanol por mol de sílice se ha calculado a partir de la ecuación III.1, tal y como ha sido descrito en la bibliografía [450]:

$$[\text{SiOH}] = \frac{(2 \times \%Q^2) + \%Q^3}{\sum (\%Q^i \times \text{EMW}_Q)} \quad (\text{ec. III.1})$$

donde $[\text{SiOH}]$ es la concentración de grupos silanol expresada en mol/g y $\%Q^i$ representa la población relativa de especies Q^i (Q^2 , Q^3 y Q^4). El peso molecular efectivo de cada especie (EMW_Q) se define como la suma del peso molecular de los átomos que contribuyen a cada especie, contando con que en los enlaces siloxano (Si-O-Si), los átomos de oxígeno que conectan especies se cuentan como medio. Dado que el experimento de polarización cruzada detecta los núcleos cercanos a protones, esto es, en la superficie o cerca de ésta, la técnica ^{29}Si CP/MAS NMR es adecuada para la determinación cuantitativa de grupos Si-OH en la superficie de sólidos.

III.3.9. Porosimetría de adsorción de gases

Adsorción de nitrógeno

La caracterización de la superficie de los materiales se llevó a cabo mediante análisis de adsorción/desorción de N_2 a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un porosímetro Micromeritics ASAP 2010. Las muestras fueron previamente desgasificadas durante 24 h a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un vacío inferior a 10^{-8} bar y las muestras cargadas con biomolécula fueron desgasificadas durante 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la degradación de la material orgánica por efecto de la temperatura. La superficie específica se ha determinado a partir de la ecuación BET (Brunauer-Emmett-Teller) [474] en el rango de presiones relativas P/P_0 0.05 a 0.35. La distribución de tamaño de poro (*pore size distribution, PSD*) se ha calculado a partir del análisis de la rama de adsorción de las isothermas empleando el método BJH [475] aplicando la corrección KJS [476]. La posición del máximo de la distribución se ha tomado como el diámetro de poro promedio (D_p). El volumen total de poro (V_T) se ha calculado empleando el método de un solo punto a $P/P_0 = 0.99$ [477]. El volumen de microporo ($V_{\mu p}$) se ha calculado empleando el método t (t -plot) [478].

Adsorción de agua e hidrocarburos

La polaridad y la microporosidad de la superficie de los materiales de sílice y de carbón sintetizados se ha estudiado a partir de la adsorción de agua y de los hidrocarburos *n*-hexano (Aldrich, 99 %) y 2,2-dimetilbutano (Aldrich, 99 %) a temperatura ambiente en un equipo de adsorción denominado balanza de Mc Bain Bakr [479,480], tal como el que se muestra en la Figura III.2. Los adsorbatos se han desgasificado previamente mediante repetidos ciclos de vacío y congelación en el sistema. Los valores de presión de saturación y la densidad de los hidrocarburos a la temperatura del experimento se tomado de la bibliografía [481]. En cada experimento, se han colocado 30 mg de muestra en un portamuestras de cuarzo suspendido de un muelle helicoidal de cuarzo. El muelle (modelo 4501.6) y el portamuestras han sido fabricados artesanalmente por Ruska Industries, Inc. La calibración previa del muelle helicoidal de cuarzo dio lugar a una constante $k = 1.264\text{ mg/mm}$. Las muestras fueron desgasificadas a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h bajo atmósfera de vacío. La presión de vapor (P/P_0) de cada adsorbato se ajustó empleando un manómetro diferencial de mercurio y el desplazamiento del muelle debido a la adsorción de las moléculas de adsorbato sobre la muestra se midió como

variación de altura registrada con un catetómetro. El equilibrio de adsorción del agua se alcanzó en 30 minutos mientras que el equilibrio de adsorción en el caso de *n*-hexano se alcanzó en 20 minutos.

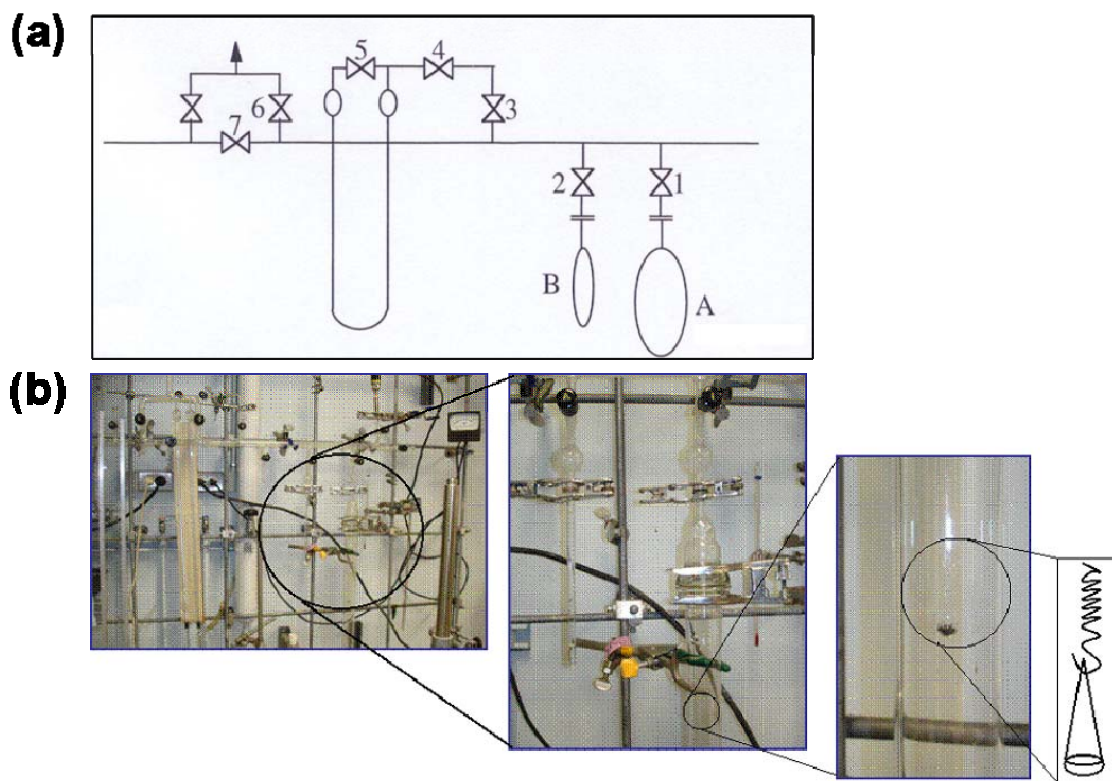


Figura III.2. (a) Esquema de la balanza de McBain-Bakr empleada para las medidas de adsorción de agua e hidrocarburos y (b) imágenes del aparato experimental.

III.3.10. Potencial zeta (ζ)

Las medidas de potencial ζ se realizaron en un equipo Malvern Zetasizer Nano Series acoplado a un valorador automático MPT-2. Se prepararon suspensiones de 10 mg de material en 10 ml de KCl 0.01 M como electrolito soporte. Las curvas de potencial ζ se monitorizaron entre pH 2 y pH 10. El pH se ajustó añadiendo cantidades adecuadas de HCl o NaOH 0.01 M. Es interesante destacar que en el rango de pH estudiado la sílice es insoluble.

III.3.11. Ángulo de contacto (θ) y energía libre superficial (γ)

Las medidas del ángulo de contacto han permitido la estimación de los componentes de la energía libre superficial. Se emplearon como líquidos sonda agua desionizada *milli-*

Q , dimetilsulfóxido (DMSO, Aldrich 99 %) y *n*-heptano (Aldrich, 99 %). Los experimentos se realizaron a 25 °C empleando el método de la gota colgante en un goniómetro CAM 200 KSV acoplado a una cámara de video.

Las muestras en polvo se comprimieron en forma de discos de 13 mm de diámetro empleando una presión uniaxial de 0.5 MPa, asegurando una superficie plana donde depositar gotas de volumen constante. Se registraron imágenes de las gotas cada 0.01 s y se empleó el método de ajuste de Young-Laplace para calcular el ángulo de contacto a partir de dichas imágenes. La energía superficial se calculó a partir de los resultados de ángulo de contacto empleando la aproximación ácido-base de Lifshitz-van der Waals desarrollada por van Oss [482], que divide la energía superficial total en dos componentes, uno dispersivo (Lifshitz-van der Waals, LW) y otro polar (ácido-base de Lewis, AB).

Los ángulos de contacto registrados cambian con el tiempo a medida que las gotas de líquido sonda son absorbidas por el material poroso. Sin embargo no se consideran como ángulos de contacto dinámicos (*avanzado* o *retrocedido*) ya que los experimentos han sido estáticos, esto es el volumen de las gotas ha sido constante durante el experimento e igual para las diferentes muestras.

III.3.12. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se han realizado en un microscopio JEOL 3000 FEG con una tensión de aceleración de 300 kV (Cs 0.6 mm, resolución 1.7 Å) el cual está lleva acoplado un analizador de energía dispersiva de rayos X (EDS) Oxford LINK y un portamuestras de doble inclinación hasta un máximo de $\pm 45^\circ$. Las imágenes se han registrado con una cámara CCD (Multiscan 794, Gatan, 1024 x 1024 píxeles, tamaño 24 μm x 24 μm) utilizando condiciones de baja dosis. El análisis y procesado de imágenes se han realizado empleando el programa *Digital Micrograph* (Gatan). Para la preparación de las muestras, se molió una pequeña cantidad en un mortero de ágata y se dispersaron mediante sonicación en etanol durante 5 minutos. Una gota de dicha suspensión se depositó sobre una rendija de cobre de 3 mm de diámetro recubierta con una película de polivinil-fornal sobre la que se ha depositado una película de carbono como soporte.

III.3.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido está constituido por un haz de electrones, focalizado a través de un sistema de lentes magnéticas. La interacción del haz de electrones acelerados sobre la muestra lleva consigo la producción de fenómenos diversos: emisión de electrones Auger, electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, etc. La señal tanto de los electrones secundarios como de los retrodispersados permite visualizar una imagen directa de la zona enfocada.

La microscopía electrónica de barrido se ha realizado en un equipo JEOL JSM6400 Oxford-Pentafet super ATW. Este microscopio trabaja con una tensión de aceleración que varía entre 0.2-40 kV. La preparación de las muestras de carbón se llevó a cabo depositando una pequeña cantidad de sólido dispersado en acetona mediante ultrasonidos sobre un portamuestras de cobre. En el caso de las muestras de fosfatos de calcio, éstas se depositaron en polvo sobre un portamuestras recubierto con una lámina de grafito. El conjunto portamuestras-muestra se metalizó con una capa muy fina de oro mediante la técnica de *sputtering* a vacío. De esta manera se asegura suficiente conductividad de las muestras y se evita que se cargue la superficie con electrones.

III.3.14. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La monitorización y detección de las biomoléculas en los ensayos de liberación *in vitro* desde los materiales de sílice sintetizados se realizó con un equipo de inyección automática Waters Alliance 2695 acoplado a un detector de diodos en serie Waters 2996 controlado por el *software* Millenium[®] 32. El detector registra los espectros de absorción en la región del visible y del ultravioleta (UV-Vis).

En el caso de la molécula de alendronato sódico, dado que no demuestra propiedades intrínsecas de absorción UV-Vis, el método cromatográfico de determinación implica la derivatización precolumna [483] del grupo amino primario con 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC, Aldrich). Para la separación se empleó una columna de fase reversa Mediterranea Sea₁₈ (Teknokroma) de dimensiones 250 x 4.6 mm con relleno de sílice funcionalizada C18 y un tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil consistió en una mezcla de solución de citrato sódico 25 mM y fosfato potásico 25 mM (pH 8.0) – acetonitrilo – metanol (75:20:5 vol%) a 35 °C a un caudal de 0.8 ml/min. El efluente fue

monitorizado a 266 nm a un tiempo de retención del derivado NaAL-FMOC de aproximadamente 8 min. Se emplearon como patrones varias disoluciones de alendronato de concentración 0, 0.25, 0.5 y 1.0 g/l en NaCl 0.9% tamponada a pH 7.4.

El protocolo para la determinación de zoledronato consiste en una fase móvil isocrática 8 mM K_2HPO_4 , 2 mM Na_2HPO_4 y 7 mM $(Bu_4N)HSO_4$ a pH 6.6 – MeOH (95:5 vol%) a 25 °C y a un caudal de 0.7 ml/min. Se empleó una columna de fase reversa Mediterranea Sea₁₈ (Teknokroma) de dimensiones 250 x 4.6 mm, con relleno de sílice funcionalizada C18 y un tamaño de partícula de 5 µm. El volumen de inyección fue de 10 µl y la detección se realizó a 215 nm, siendo el tiempo de retención de aproximadamente 7 min. Se emplearon como patrones varias disoluciones de zoledronato de concentración 0.1-10 g/l en NaCl 0.9% tamponada a pH 7.4.

La determinación de *L*-Trp se llevó a cabo con una columna Waters XTerra RP18 150 × 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 µm. Se utilizó el modo isocrático en el que la fase móvil consistió en una mezcla 25 mM acetato sódico con 0.02% azida sódica (NaN_3 , Aldrich) a pH 5.7 – MeOH (91:9, vol%) a 0.7 ml/min y 37 °C. La detección se realizó a 278 nm, siendo el tiempo de retención de *L*-Trp de aproximadamente 8 min. El calibrado se llevó a cabo con disoluciones de *L*-Trp de concentración 0.1-10 g/l en NaCl 0.9% tamponada a pH 7.4.

La determinación de la proteína albúmina sérica bovina se llevó a cabo con una columna Waters Symmetry300 C4 150 × 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil en gradiente consistió en una mezcla de una disolución acuosa 0.1% ácido trifluoroacético (TFA 99%, Fluka) y una solución 0.08% TFA en acetonitrilo (HPLC grade, Aldrich) (80:20, vol%) que, tras 15 minutos pasó a ser (35:65, vol%). El flujo de fase móvil fue 0.75 ml/min y la temperatura de la columna de 40 °C. La detección se realizó a 220 nm, siendo el tiempo de retención de BSA de aproximadamente 1.5 min. El calibrado se llevó a cabo con disoluciones de BSA de concentración 0.1-10 g/l en NaCl 0.9% tamponada a pH 7.4.



PARTE IV. BIBLIOGRAFÍA

-
- 1 M. Vallet-Regí. Ceramics for medical applications. Perspective Article. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 2001, 97-108.
 - 2 M. Vallet-Regí. Revisiting ceramics for medical applications. Perspective Article. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 2006, 5211-5220.
 - 3 L.L. Hench, J. Wilson. An introduction to bioceramics. In: L.L. Hench, J. Wilson (Eds.): Advanced series in ceramics, Vol. 1, World Scientific, 1993.
 - 4 M. Vallet-Regí. Bioceramics: where do we come from and which are the future expectations. In: M. Vallet-Regí (Ed.): Progress in Bioceramics. Key Eng. Mater. 2008, 377, 1-18. Trans. Tech. Publications, Ltd. Switzerland.
 - 5 L.L. Hench, J.K. West. The sol-gel process. Chem. Rev. 1990, 90, 33-72.
 - 6 C.J. Brinker, G.W. Scherer. Sol-gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing, Academic Press Inc. US. 1990.
 - 7 S. Radin, G. El-Bassyouni, E.J. Vresilovic, E. Schepers, P. Ducheyne. In vivo tissue response to resorbable silica xerogels as controlled-release materials. Biomaterials 2005, 26, 1043-1052.
 - 8 P. Kortesus, M. Ahola, S. Karlsson, I. Kangasniemi, A. Yli-Urpo, J. Kiesvaara. Silica xerogel as an implantable carrier for controlled drug delivery-evaluation of drug distribution and tissue effects after implantation. Biomaterials 2000, 21, 193-198.
 - 9 S. Chia, J. Urano, F. Tamanoi, B. Dunn, J.I. Zink. Patterned hexagonal arrays of living cells in sol-gel silica films. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 6488-6489.
 - 10 C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. Nature 1992, 359, 710-712.
 - 11 IUPAC manual of symbols and terminology, Appendix 2, Part I. Colloid and surface chemistry. Pure Appl. Chem. 1972, 31, 578.
 - 12 M.E. Davis. Porous solids for emerging applications. Nature 2002, 417, 813-821.
 - 13 F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 3216-3251.
 - 14 M. Vallet-Regí, A. Rámila, R.P. del Real, J. Pérez-Pariente. A new property of MCM-41: drug delivery system. Chem. Mater. 2001, 13, 308-311.

-
- 15 F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí. Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 8116-8117.
 - 16 M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 7548-7558.
 - 17 M. Vallet-Regí. Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering. *Chem. Eur. J.* 2006, 12, 5934-5943.
 - 18 M. Manzano, M. Vallet-Regí. New developments in ordered mesoporous materials for drug delivery. *J. Mater. Chem.* 2010, doi: 10.1039/b922651f.
 - 19 M. Vallet-Regí, L. Ruiz-González, I. Izquierdo-Barba, J.M. González-Calbet. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *J. Mater. Chem.* 2006, 16, 26-31.
 - 20 M. Vallet-Regí, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. *Prog. Solid State Chem.* 2008, 36, 163-191.
 - 21 M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba. Bioactive mesoporous silicas as controlled delivery systems: applications in bone tissue regeneration. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2008, 4, 1-15.
 - 22 D. Radu, C.Y. Lai, K. Jeftinija, E.W. Rowe, S. Jeftinija, V.S.-Y. Lin. A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 13216-13217.
 - 23 B.G. Trewyn, J.A. Nieweg, Y. Zhao, V.S.-Y. Lin. Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration. *Chem. Eng. J.* 2008, 137, 23-29.
 - 24 T.H. Chung, S.H. Wu, M. Yao, C.W. Lu, Y.S. Lin, Y. Hung, C.Y. Mou, Y.C. Chen, D.M. Huang. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2008, 28, 2959-2966.
 - 25 H.H.P. Yiu, P. Wright. Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 3690-3700.
 - 26 M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí. Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *Int. J. Nanomed.* 2008, 3, 403-414.

-
- 27 S. Hudson, J. Cooney, E. Magner. Proteins in mesoporous silicates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 8582-8594.
- 28 J. Livage. *Chimie douce: from shake-and-bake processing to wet chemistry.* New J. Chem. 2001, 25, 1.
- 29 H. Isobe, K. Kaneko. Porous silica particles prepared from silicon tetrachloride using ultrasonic spray method. *J. Colloid Interf. Sci.* 1999, 212, 234-241.
- 30 K. Yoshida, M. Tanagawa, K. Kamada, R. Hatada, K. Bada, T. Inoi, M. Atsuna. Silica coatings formed on nobel dental casting alloy by the sol-gel dipping process. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 46, 221-227.
- 31 S.-B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, T. Kitsugi, T. Yamamuro. Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. *J. Am. Ceram. Soc.* 1995, 78, 1769-1774.
- 32 L.L. Hench, D.R. Ulrich (Eds.): *Ultrastructure processing of ceramic, glasses, and composites.* Wiley, NY, 1984.
- 33 S. Sakka, T. Yoko. Fibers from gels. *J. Non-Cryst. Solids* 1992, 147&148, 394-403.
- 34 R. Viitala, M. Jokinen, J.B. Rosenholm. Mechanistic studies on release of large and small molecules from biodegradable SiO₂. *Int. J. Pharm.* 2007, 336, 382-390.
- 35 C. Sánchez, B. Julián, P. Belleville, M. Popall. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 3559-3592.
- 36 D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chem. Mater.* 1994, 6, 1605-1614.
- 37 I. Gill. Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chem. Mater.* 2001, 13, 3404-3421.
- 38 J. Zink, F. Nishida, S. Yamanaka, C. Nishida, L. Ellerby, B. Dunn, J. Valentine. Sol-gel encapsulated enzyme. PCT Patent, WO 93/04196, PCT/US92/06786, 1993.
- 39 D. Arcos, J. Peña, M. Vallet-Regí. Influence of a SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel on the bioactivity and controlled release of a ceramic/polymer/antibiotic mixed materials. *Chem. Mater.* 2003, 15, 4132-4138.
- 40 R. Viitala, M. Jokinen, S. Tuusa, J.B. Rosenholm, H. Jalonon. Adjustably bioresorbable sol-gel derived SiO₂ matrices for release of large biologically active molecules. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 2005, 36, 147-156.

-
- 41 T. Czuryshkiewicz, J. Ahvenlammi, P. Korteso, M. Ahola, F. Kleitz, M. Jokinen, M. Lindén, J. B. Rosenholm. Drug release from biodegradable silica fibers. *J. Non-Cryst. Solids* 2002, 306, 1-10.
- 42 M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, A.J. Salinas. Glasses with medical applications. *Eur. J. Inor. Chem.* 2003, 6, 1029-1042.
- 43 R.M. Barrer, P.J. Denny. Hydrothermal chemistry of the silicates. Part IX. Nitrogenous aluminosilicates. *J. Chem. Soc.* 1961, 971-982.
- 44 A. Corma. From microporous to mesoporous molecular sieves materials and their use in catalysis. *Chem. Rev.* 1997, 97, 2373-2419.
- 45 M. Antonietti. Surfactants for novel templating applications. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 2001, 6, 244-248.
- 46 V. Chiola, J.E. Ritsko, C.D. Vanderpool. US Patent No. 3 556 725, 1971.
- 47 F. Di Renzo, H. Cambon, R. Dutartre. A 28-year-old synthesis of micelle-templated mesoporous silica. *Micropor. Mater.* 1997, 10, 283-286.
- 48 T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, C. Kato. The preparation of alkyltriethylammonium-kaneinite complexes and their conversion to microporous materials. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1990, 63, 988-992.
- 49 P. Bherens. Mesoporous inorganic solids. *Adv. Mater.* 1993, 5, 127-132.
- 50 H. Yang, N. Coombs, I. Sokolov, G.A. Ozin. Free-standing and oriented mesoporous silica films grown at the air-water interface. *Nature* 1996, 381, 589-592.
- 51 C.J. Brinker, Y.F. Lu, A. Sellinger, H.Y. Fan. Evaporation-induced-self-assembly: nanostructures made easy. *Adv. Mater.* 1999, 11, 579-585.
- 52 X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao. A highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 5980-5984.
- 53 A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí. Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration. *Chem. Mater.* 2006, 18, 3137-3144.
- 54 C.A. Millar, P. Neogi. Interfacial phenomena equilibrium and dynamic effects. *Surfactant Series Vol. 17*, Marcel Dekker Inc. 1985.
- 55 J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1976, 72, 1525-1568.

-
- 56 G. J. de A.A. Soler-Illia, C. Sánchez, B. Lebeau, J. Patarin. Chemical strategies to design textured materials: from microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chem. Rev.* 2002, 102, 4093-4138.
- 57 J.M. Seddon, M.E. Raimondi. Liquid crystal templating of mesoporous materials. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* 2000, 347, 221-229.
- 58 A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R.S. Maxwell, G. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. Chmelka. Cooperative formation of inorganic-organic interfaces in the synthesis of silicate mesostructures. *Science* 1993, 261, 1299-1303.
- 59 J. Patarin, B. Lebeau, R. Zana. Recent advances in the formation mechanisms of organized mesoporous materials. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 2002, 7, 107-115.
- 60 Q. Huo, D.I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P.M. Petroff, F. Schüth, G.D. Stucky. Generalized synthesis of periodic surfactant inorganic composite-materials. *Nature* 1994, 368, 317-321.
- 61 P.T. Tanev, T.J. Pinnavaia. A neutral templating route to mesoporous molecular-sieves. *Science* 1995, 267, 865-867.
- 62 A. Lind, J. Andersson, S. Karlsson, P. Ågren, H. Bussian, H. Amenitsch, M. Lindén. Controlled solubilization of toluene by silicate-cationic surfactant mesophases as studied by in situ and ex situ XRD. *Langmuir* 2002, 18, 1380-1385.
- 63 P. Schmidt-Winkel, W.W. Lukens, D.Y. Zhao, P.D. Yang, B.F. Chmelka, G.D. Stucky. Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 254-255.
- 64 K. Flodström, V. Alfredsson. Influence of the block length of triblock copolymers on the formation of mesoporous silica. *Microporous Mesoporous Mater.* 2003, 59, 167-176.
- 65 A. Corma, Q. Kan, M.T. Navarro, J. Pérez-Pariante, F. Rey. Synthesis of MCM-41 with different pore diameters without addition of auxiliary organics. *Chem. Mater.* 1997, 9, 2123-2126.
- 66 S. Che, Z. Liu, T. Ohsuna, K. Sakamoto, O. Terasaki, T. Tatsumi. Synthesis and characterization of chiral mesoporous silica. *Nature* 2004, 429, 281-284.
- 67 D.Y. Zhao, J.L. Feng, Q.S. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 1998, 279, 548-552.

-
- 68 S.A. Bagshaw, E. Prouzet, T.J. Pinnavaia. Templating of mesoporous molecular-sieves by non-ionic polyethylene oxide surfactants. *Science* 1995, 269, 1242-1244.
- 69 R. Ryoo, J.M. Kim, C.H. Ko, S.H. Shin. Disordered molecular sieve with branched mesoporous channel network. *J. Phys. Chem. B.* 1996, 100, 17718-17721.
- 70 S. Inagaki, A. Koiwai, N. Suzuki, Y. Fukushima, K. Kuroda. Syntheses of highly ordered mesoporous materials, FSM-16, derived from kanemite. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1996, 69, 1449-1457.
- 71 C. Yu, Y. Yu, D.Y. Zhao. Highly ordered large caged cubic mesoporous silica structures templated by triblock PEO-PPO-PEO copolymer. *Chem. Commun.* 2000, 575-576.
- 72 S. Che, A.E. García-Bennett, T. Yokoi, K. Sakamoto, H. Kunieda, O. Terasaki, T. Tatsumi. Mesoporous silica of novel structures with periodic modulations synthesised by anionic surfactant templating route. *Nat. Mater.* 2003, 2, 801-805.
- 73 M. Strømme, U. Brohede, R. Atluri, A.E. Garcia-Bennett. Mesoporous silica-based nanomaterials for drug delivery: evaluation of structural properties associated with release rate. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009, 1, 140-148.
- 74 D. Margolese, J.A. Melero, S.C. Christiansen, B.F. Chmelka, G.D. Stucky. Direct synthesis of ordered SBA-15 mesoporous silica containing sulfonic acid groups. *Chem. Mater.* 2000, 12, 2448-2459.
- 75 C.-Y. Chen, H.-X. Li, M.E. Davis. Studies on mesoporous materials: I. Synthesis and characterization of MCM-41. *Micropor. Mater.* 1993, 2, 17-26.
- 76 S. Kawi, M.W. Lai. Supercritical fluid extraction of surfactant template from MCM-41. *Chem. Commun.* 1998, 13, 1407-1408.
- 77 B. Tian, X. Liu, C. Yu, F. Gao, Q. Luo, S. Xie, B. Tu, D. Zhao. Microwave assisted template removal of siliceous porous materials. *Chem. Commun.* 2002, 1186-1187.
- 78 M.T.J. Keene, R. Denoyel, P.L. Llewellyn. Ozone treatment for the removal of surfactant to from MCM-41 type materials. *Chem. Commun.* 1998, 20, 2203-2204.
- 79 T. Linssen, K. Cassiers, P. Cool, E.F. Vansant. Mesoporous templated silicates: An overview of their synthesis, catalytic activation and evaluation of the stability. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 2003, 103, 121-147.

-
- 80 P. Van der Voort, M. Baltes, E.F. Vansant. Synthesis of stable, hydrophobic MCM-48/VOx catalysts using alkylchlorosilanes as coupling agents for the molecular designed dispersion of VO(acac). *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 10102-10108.
- 81 S. Kawi, S.-C. Chen. Effects of structural and non-structural Al species on the stability of MCM-41 materials in boiling water. *Mater. Lett.* 2000, 42, 108-112.
- 82 L. Chen, T. Horiuchi, T. Mori, K. Maeda. Postsynthesis hydrothermal restructuring of M41S mesoporous molecular sieves in water. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 1216-1222.
- 83 Q.S. Huo, J.L. Feng, F. Schüth, G.D. Stucky. Preparation of hard mesoporous silica spheres. *Chem. Mater.* 1997, 9, 14-17.
- 84 S. Schacht, Q. Huo, I.G. Voigt-Martin, G.D. Stucky, F. Schüth. Oil-water interface templating of mesoporous macroscale structure. *Science* 1996, 273, 768-771.
- 85 K. Schumacher, M. Grun, K.K. Unger. Novel synthesis of spherical MCM-48. *Microporous Mesoporous Mater.* 1999, 5, 201-206.
- 86 Q. Huo, D. Zhao, J. Feng, K. Weston, S.K. Buratto, G.D. Stucky, S. Schacht, F. Schüth. Room temperature growth of mesoporous silica fibers: A new high-surface-area optical waveguide. *Adv. Mater.* 1997, 9, 974-978.
- 87 F. Kleitz, U. Wilczok, F. Schüth, F. Marlow. Hollow mesoporous silica fibers: tubules by coils of tubules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001, 3, 3486-3489.
- 88 H. Yang, A. Kuperman, N. Coombs, S. Mamiche-Afara, G.A. Ozin. Synthesis of oriented films of mesoporous silica on mica. *Nature* 1996, 379, 703-705.
- 89 D. Grosso, F. Cagnol, G.J. De A.A. Soler-Illia, E.L. Crepaldi, H. Amenitsch, A. Brunet-Bruneau, A. Burgeois, C. Sánchez. Fundamentals of mesostructuring through evaporation-induced self-assembly. *Adv. Funct. Mater.* 2004, 14, 309-322.
- 90 Y.F. Lu, R. Ganguli, S.A. Drewien, M.T. Anderson, C.J. Brinker, W.L. Woong, Y.X. Guo, H. Soyeze, B. Dunn, M.H. Huang, J.I. Zink. Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol-gel dip-coating. *Nature* 1997, 389, 364-368.
- 91 G.E. Fryxell. The synthesis of functional mesoporous materials. *Inorg. Chem. Commun.* 2006, 9, 1141-1150.
- 92 U. Ciesla, R. Leon, D. Demuth, P. Petroff, G. Stucky, K. Unger, F. Schüth. Surfactant controlled preparation of mesostructured transition-metal oxide compounds. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 1387-1388.

-
- 93 D.M. Antonelli, J.Y. Ying. Synthesis of hexagonally packed mesoporous TiO_2 by a modified sol-gel method. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34, 2014-2017.
- 94 U. Ciesla, S. Schacht, G.D. Stucky, K.K. Unger, F. Schüth. Formation of a porous zirconium oxo phosphate with a high surface area by a surfactant-assisted synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1996, 35, 541-543.
- 95 F. Kleitz, S.J. Thomson, Z. Liu, O. Terasaki, F. Schüth. Porous mesostructured zirconium oxophosphate with cubic (Ia3d) symmetry. *Chem. Mater.* 2002, 14, 4134-4144.
- 96 J.Y. Ying, C.P. Mehnert, M.S. Wong. Synthesis and applications of supramolecular templated mesoporous materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 56-77.
- 97 R. Ryoo, S.H. Hoo, M. Kruk, M. Jaroniec. Ordered Mesoporous Carbons. *Adv. Mater.* 2001, 13, 677-681.
- 98 A. Taguchi, F. Schüth. Ordered mesoporous materials in catalysis. *Microporous Mesoporous Mater.* 2005, 77, 1-45.
- 99 Y. Sakamoto, A. Fukuoka, T. Higuchi, N. Shimomura, S. Inagaki, M. Ichikawa. Synthesis of platinum nanowires in organic-inorganic mesoporous silica templates by photoreduction: formation mechanism and isolation. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 853-858.
- 100 F. Schüth. Endo-and exotemplating to create high surface area inorganic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3604-3622.
- 101 Z.-Y. Yuan, B.-L. Su. Insights into hierarchically meso-macroporous structured materials *J. Mater. Chem.* 2006, 16, 663-677.
- 102 J. García Martínez. Sólidos ordenados: desde la nano a la macroestructura. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* 2006, 102, 5-12.
- 103 M.H. Lim, A. Stein. Comparative studies of grafting and direct synthesis of inorganic-organic hybrid mesoporous materials. *Chem. Mater.* 1999, 11, 3285-3295.
- 104 S. Abramson, M. Lasperas, A. Galarneau, D. Desplantier-Giscard, D. Brunel. Best design of heterogenized β -aminoalcohols for improvement of enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehyde. *Chem. Commun.* 2000, 1173-1774.
- 105 N. García, E. Benito, J. Guzmán, P. Tiemblo, V. Morales, R.A. García. Functionalization of SBA-15 by an acid-catalyzed approach: a surface characterization study. *Microporous Mesoporous Mater.* 2007, 106, 129-139.

-
- 106 R.K. Zeidan, S.-J. Hwang, M.E. Davis. Multifunctional heterogeneous catalysts: SBA-15 containing primary amines and sulfonic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 6332-6335.
- 107 E.L. Margelefsky, A. Bendjeriou, R.K. Zeidan, V. Dufaud, M.E. Davis. Nanoscale organization of thiol and arylsulfonic acid on silica leads to a highly active and selective bifunctional, heterogeneous catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13442-13449.
- 108 L. Han, J. Ruan, Y. Li, O. Terasaki, S. Che. Synthesis and characterization of the amphoteric amino acid bifunctional mesoporous silica. *Chem. Mater.* 2007, 19, 2860-2867.
- 109 M.H. Lim, C.F. Blanford, A. Stein. Synthesis and characterization of a reactive vinyl-functionalized MCM-41: probing the internal pore structure by a bromination reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 4090-4091.
- 110 D.S. Shephard, W. Zhou, T. Maschmeyer, J.M. Matters, C.L. Roper, S. Parsons, B.F.G. Jonson, M.J. Duer. Site-directed surface derivatization of MCM-41: use of high-resolution transmission electron microscopy and molecular recognition for determining the position of functionality within mesoporous materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2719-2723.
- 111 F. De Juan, E. Ruiz-Hitzky. Selective functionalization of mesoporous silica. *Adv. Mater.* 2000, 12, 430-432.
- 112 K. Cheng, C.C. Landry. Diffusion-based deprotection in mesoporous materials: a strategy for different functionalization of porous silica particles. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 9674-9685.
- 113 N. Gartman, D. Brühwiler. Controlling and imaging the functional-group distribution on mesoporous silica. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6354-6356.
- 114 A. Stein, B.J. Melde, R.C. Schroden. Hybrid inorganic-organic mesoporous silicates-nanoscale reactors coming of age. *Adv. Mater.* 2000, 12, 1403-1419.
- 115 M. Ganschow, M. Wark, D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff. Anchoring of functional dye molecules in MCM-41 by microwave-assisted hydrothermal cocondensation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 161-163.
- 116 D.F. Williams. *The Williams dictionary of biomaterials.* University Press, Liverpool, 1999.

-
- 117 D.F. Williams. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 2008, 29, 2941-2953.
- 118 J.K. McLaughlin, W.H. Chow, L.S. Levy. Amorphous silica: a review of health effects from inhalation exposure with particular reference to cancer. *J. Toxicol. Environ. Health* 1997, 50, 553-566.
- 119 E.M. Carlisle. Silicon: An essential element for the chick. *Science* 1972, 178, 619-621.
- 120 K.R. Martin. The chemistry of silica and its potential health benefits. *J. Nutr. Health. Aging* 2007, 11, 94-98.
- 121 A.H. Mayne, S.C. Bayliss, P. Barr, M. Tobin, L.D. Buckberry. Biologically interfaced porous silicon devices. *Phys. Stat. Sol.* 2000, 182, 505-513.
- 122 C. Barbé, J. Bartlett, L.G. Kong, K. Finnie, H.Q. Lin, M. Larkin, S. Calleja, A. Bush, G. Calleja. Silica particles: a novel drug-delivery system. *Adv. Mater.* 2004, 16, 1959-1966.
- 123 A. Kros, M. Gerritse, V.S.I. Sprakel, N.A.J.M. Sommerdijk, J.A. Jansen, R.J.M. Nolte. Silica based hybrid materials as biocompatible coatings for glucose sensors. *Sensors Actuators B* 2001, 81, 68-75.
- 124 S.I. Anderson, S. Downes, C.C. Perry, A.M. Caballero. Evaluation of the osteoblast response to a silica gel in vitro. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1998, 9, 731-735.
- 125 M. Colilla, M. Vallet-Regí. Novel insights into ordered mesoporous materials for biomedical applications. In: W. Kosser, J. Fuchs (Eds.): *Bioceramics. Properties, preparation and applications*. Nova Science Publishers Inc. NY, 2009.
- 126 J.-S. Chang, K.L.B. Chang, D.-F. Hwang, Z.-L. Kong. In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 2064-2068.
- 127 Y.S. Lin, C.P. Tsai, H.Y. Huang, C.T. Kuo, Y. Hung, D.M. Huang, Y.C. Chen, C.Y. Mou. Well-ordered mesoporous silica nanoparticles as cell markers. *Chem. Mater.* 2005, 17, 4570-4573.
- 128 A.J. Di Pasqua, K.K. Sharma, Y.L. Shi, B.B. Toms, W. Ouellette, J.C. Dabrowiak, T. Asefa. Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1416-1423.

-
- 129 Z. Tao, B. B. Toms, J. Goodisman, T. Asefa. Mesoporosity and functional group dependent endocytosis and cytotoxicity of silica nanomaterials. *Chem. Res. Toxicol.* 2009, 22, 1869-1880.
- 130 D. Lozano, M. Manzano, J.C. Doadrio, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, E. Gómez-Barrena, P. Esbrit. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater.* 2010, 6, 797-803.
- 131 I. Slowing, B.G. Trewyn, V.S.-Y. Lin. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 14792-14793.
- 132 T. López, E.I. Basaldella, M.L. Ojeda, J. Manjarrez, R. Alexander-Katz. Encapsulation of valproic acid and sodic phenytoin in ordered mesoporous SiO₂ solids for the treatment of temporal lobe epilepsy. *Opt. Mater.* 2006, 29, 75-81.
- 133 S.H. Wu, Y.S. Lin, Y. Hung, Y.H. Chou, Y.H. Hsu, C. Chang, C.Y. Mou. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for intracellular labeling and animal magnetic resonance imaging studies. *ChemBioChem.* 2008, 9, 53-57.
- 134 V. Gómez-Gil, C. Trejo, N. García-Honduvilla, D. Lozano, M. Bellido, J.C. Doadrio, M. Vallet-Regí. Mimetic biomaterials in compromised bone repair: PTHrP peptide (107-111)-releasing silica mesoporous biomaterial improves bone neoformation in an experimental model of osteoporosis. 22nd European Conference on Biomaterials, 7-11 September 2009, Lausanne, Switzerland.
- 135 S.P. Hudson, R.F. Padera, R. Langer, D.S. Kohane. Biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials* 2008, 29, 4045-4055.
- 136 E. Bisse, T. Epting, A. Beil, G. Lindinger, H. Lang, H. Wieland. Reference values for serum silicon in adults. *Anal. Biochem.* 2005, 337, 130-135.
- 137 W. Lai, P. Ducheyne, J. Garino. Removal pathway of silicon released from bioactive glass granules in vivo. In: R.Z. Geros, J.P. LeGeros (Eds.): *Bioceramics* 11. World Scientific Publishing, NY, 1998.
- 138 D.M. Reffitt, R. Jugdaohsingh, R.P.H. Thompson, J. J. Powell. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *J. Inorg. Biochem.* 1999, 76, 141-147.
- 139 M. Jokinen, M. Koskinen, S. Areva. Rationale of using conventional sol-gel derived SiO₂ for delivery of biologically active agents. *Key Eng. Mat.* 2008, 377, 195-210.

-
- 140 M. Jokinen, M. Koskinen, H. Jalonen. International Patent Application PCT/FI2007/000136 (2007).
- 141 J.D. Bass, D. Grosso, C. Boissiere, E. Belamie, T. Coradin, C. Sánchez. Stability of mesoporous oxide and mixed metal oxide materials under biologically relevant conditions. *Chem. Mater.* 2007, 19, 4349-4356.
- 142 A. García, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. Incorporation of phosphorus into mesostructured silicas: a novel approach to reduce the SiO₂ leaching in water. *Chem. Mater.* 2009, 21, 4135-4145.
- 143 I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí. In vitro stability of SBA-15 under physiological conditions. *Microporous Mesoporous Mater.* 2010, 132, 442-452.
- 144 R.Z. LeGeros, R.G. Craig. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J. Bone Miner. Res.* 1993, 8, S583-596.
- 145 L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1972, 5, 117-141.
- 146 L.L. Hench, J. Polak. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002, 295, 1014-1017.
- 147 I. Izquierdo-Barba, L. Ruiz-González, J.C. Doadrio, J.M. González-Calbet, M. Vallet-Regí. Tissue regeneration: a new property of mesoporous materials. *Solid State Sci.* 2005, 7, 983-989.
- 148 M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, F. Babonneau, J.M. González-Calbet, M. Vallet-Regí. Phosphorous-doped MCM-41 as bioactive material. *Solid State Sci.* 2005, 7, 233-237.
- 149 P. Horcajada, A. Rámila, K. Boulahya, J. González-Calbet, M. Vallet-Regí. Bioactivity in ordered mesoporous materials. *Solid State. Sci.* 2004, 6, 1295-1300.
- 150 R. Langer. New methods for drug delivery. *Science* 1990, 249, 1527-1533.
- 151 H. Uludag, P. De Vos, P.A. Tresco. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 42, 29-64.
- 152 S. Padilla, R.P. del Real, M. Vallet-Regí. In vitro release of gentamicin from OHAp/PEMA/PMMA samples. *J. Controll. Rel.* 2002, 83, 343-352.
- 153 E. Fournier, C. Passirani, C.N. Montero-Menei, J.P. Benoit. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* 2003, 24, 3311-3331.

-
- 154 G. Orive, R. M. Hernández, A. Rodríguez Gascon, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, J.L. Pedraz. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol.* 2004, 22, 87-92.
- 155 J.F.T. Conroy, M.E. Power, J. Martin, B. Earp, B. Hosticka, C.E. Daitch, P.M. Norris. Cells in sol-gels. I. A cytocompatible route for the production of macroporous silica gels. *J Sol-gel Sci. Technol.* 2000, 18, 269-283.
- 156 T. Coradin, M. Boissière, J. Livage. Sol-gel chemistry in medicinal science. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13, 99-108.
- 157 G. Carturan, R. Dal Tosso, S. Boninsegna, R. Dal Monte. Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 2087-2098.
- 158 K.P. Peterson, C.M. Peterson, E.J.A. Pope. Silica sol-gel encapsulation of pancreatic islets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998, 218, 365-369.
- 159 P. De Vos, P. Marchetti. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends Mol. Med.* 2002, 8, 363-866.
- 160 M. Muraca, M.T. Vilei, G.E. Zanusso, A. Ferraresso, S. Boninsegna, R. Sal Monte, P. Carraro, G. Carturan. SiO₂ entrapment of animal cells: liver-specific metabolic activities in silica-overlaid hepatocytes. *Artif. Organs* 2002, 26, 664-669.
- 161 A.J. Strain, J.M. Neuberger. A bioartificial liver-state of the art. *Science* 2002, 295, 1005-1009.
- 162 G.H. Nancollas, R. Tang, R.J. Phipps, Z. Henneman, S. Gulde, W. Wu, A. Mangood, R.G.G. Russell, F.H. Ebetino. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006, 38, 617-627.
- 163 G.A. Rodan, T.J. Martin. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000, 289, 1508-1514.
- 164 Q. Fu, G.V. Rama Rao, L.K. Ista, Y. Wu, B.P. Andrzejewski, L.A. Sklar, T.L. Ward, G.P. López. Control of molecular transport through stimuli-responsive ordered mesoporous materials. *Adv. Mater.* 2003, 15, 1262-1266.
- 165 N.K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature* 2003, 421, 350-353.

-
- 166 S. Giri, B.G. Trewyn, M.P. Stellmaker, V.S.-Y.Lin. Stimuli-responsive controlled-release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5038-5044.
- 167 S.W. Song, K. Hidajat, S. Kawi. pH-controllable drug release using hydrogel encapsulated mesoporous silica. *Chem. Commun.* 2007, 4369-4398.
- 168 M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, D. Arcos, M. Clavel-Sainz, L. Meseguer-Olmo. Métodos para la obtención de implantes bioactivos útiles como sistemas de liberación controlada. 2001. Spanish Patent no. P22001-01386.2181593.
- 169 V. Mouriño, A.R. Boccaccini. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *J. R. Soc. Interface.* 2010, 7, 209-227.
- 170 W. Frieb, J. Werner. Biomedical applications. In: F. Schüth, S. Kenneth, W. Sing, W. Kamps (Eds.): *Handbook of Porous Solids*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.
- 171 S. Sánchez-Salcedo, J. Werner, M. Vallet-Regí. Hierarchical pore structure of calcium phosphate scaffolds by combination of the gel casting and multiple tape casting methods. *Acta Biomater.* 2008, 4, 913-922.
- 172 S.J. Hollister. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* 2005, 4, 518-524.
- 173 M. Vallet-Regí. Current trends on porous inorganic materials for biomedical applications. *Chem. Eng. J.* 2008, 137, 1-3.
- 174 A. Baeza, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. Biotinylation of silicon-doped hydroxyapatite: A new approach to protein fixation for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2010, 6, 743-749.
- 175 M. Vallet-Regí. Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *J. Int. Med.* 2010, 267, 22-43.
- 176 F. Lim, A.M. Sun. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980, 210, 908-910.
- 177 C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su. Encapsulation of cells within silica matrices: towards a new advance in the conception of living hybrid materials. *J. Colloid Interf. Sci.* 2010, 342, 211-224.
- 178 W. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21, 2529-2543.

-
- 179 W.G. Koh, A. Revzin, M.V. Pishko. Poly(ethylene glycol) hydrogel microstructures encapsulating living cells. *Langmuir* 2002, 18, 2459-2462.
- 180 S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami. MIN6 cells-enclosing aminopropyl-silicate membrane templated by alginate gels differences in guluronic acid content. *Int. J. Pharm.* 2004, 270, 65-73.
- 181 G. Orive, R.M. Hernandez, A.R. Gascon, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. De Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacik, A.M.J. Shapiro, J.L. Pedraz. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nat. Med.* 2003, 9, 104-107.
- 182 J. Livage, T. Coradin, C. Roux. Encapsulation of biomolecules in silica gels. *J. Phys.: Condens. Matter.* 2001, 13, R673-R691.
- 183 Y. Fukushima, K. Okamura, K. Imai, H. Motai. A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate. *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 32, 584-594.
- 184 G. Carturan, R. Campostrini, S. Dire, V. Scardi, E. De Alteriis. Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets. *J. Mol. Catal.* 1989, 57, L13L-16.
- 185 S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi. Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Mater. Lett.* 1990, 10, 1-5.
- 186 M. Rietti-Shatti, D. Ronen, R.T. Mandelbaum. Atrazine degradation by *Pseudomonas* strain ADP entrapped in sol-gel glass. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 1996, 7, 77-79
- 187 E.J.A. Pope, K. Braun, C.M. Peterson. Bioartificial organs I: silica gel encapsulated pancreatic islets for the treatment of diabetes mellitus. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 1997, 8, 635-639.
- 188 G. Kuncová, O. Podrazky, S. Ripp, J. Trogl, G.S. Sayler, K. Demnerova, R. Vankova. Monitoring of the viability of cells immobilized by sol-gel process. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 2004, 31, 335-342.
- 189 M.L. Ferrer, L. Yuste, F. Rojo, F del Monte. Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrices. *Chem. Mater.* 2003, 15, 3614-3618.

-
- 190 J. Livage, T. Coradin. Encapsulation of enzymes, antibodies and bacteria. In: S. Sakka (Ed.): Handbook of sol-gel science and technology-processing, characterization and applications, Vol. III- Applications of sol-gel technology. Springer, 2005.
- 191 E.J.A. Pope. Encapsulation of animal and microbial cells in an inorganic gel prepared from an organosilicon, US Pat., April 14, 1998, 5, 739, 020.
- 192 H.K. Baca, E. Carnes, S. Singh, C. Ashley, D. Lopez, C.J. Brinker. Cell-directed assembly of bio/nano interfaces- A new scheme for cell immobilization. *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 836-845.
- 193 T. Coradin, J. Livage. Aqueous silicates in biological sol-gel applications: new perspectives for old precursors. *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 819-826.
- 194 S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami. Proliferation and insulin secretion function of mouse insulinoma cells encapsulated in alginate/sol-gel synthesized aminopropyl-silicate/alginate microcapsule. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 2003, 28, 267-272.
- 195 H. Böttcher, U. Soltmann, M. Mertig, W. Pompe. Biocers: ceramics with incorporated microorganisms for biocatalytic, biosorptive and functional materials development. *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 2176-2188.
- 196 G. Carturan, R. Camprostrini, L. Tognana, S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte. Gas-phase silicon alkoxide reactivity vs. Na-alginate droplets for conjugation of alginate and sol-gel technologies. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 2006, 37, 69-77.
- 197 C.J. Kim. Controlled release dosage form design. CRC Press. 2000.
- 198 P. Costa, J.M.S. Lobo. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 13, 123-133.
- 199 R.K. Verma, D.M. Krishna, S. Garg. Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems. *J. Control. Release* 2002, 79, 7-27.
- 200 P. Gupta, K. Vermani, S. Garg. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov. Today* 2002, 7, 569-579.
- 201 J. Siepmann, A. Göpferich. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2001, 48, 229-247.

-
- 202 A. El-Aneed. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Control. Rel.* 2004, 94, 1-14.
- 203 J. Kost, R. Langer. Responsive polymeric delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 46, 125-148.
- 204 Y. Wang, R. Thakur, Q. Fan, B. Michniak. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005, 60, 179-191.
- 205 M. Goldberg, R. Langer, X.Q. Jia. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007, 18, 241-268.
- 206 L.L. Hench, J. Wilson. Surface-active biomaterials. *Science* 1984, 226, 630-636.
- 207 S.-W. Song, K. Hidajat, S. Kawi. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* 2005, 21, 9568-9575.
- 208 F. Balas, M. Manzano, M. Colilla, M. Vallet-Regí. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater.* 2008, 4, 514-522.
- 209 C.Y. Lai, B.G. Trewyn, D.M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V.S.-Y. Lin. A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of neurotransmitters and drug molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 4451-4459.
- 210 R. Hernández, H.R. Tseng, J.W. Wong, J.F. Stoddart, J.I. Zink. An operational supramolecular nanovalve. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 3370-3371.
- 211 H. Chang, C.H. Shim, B.J. Kim, Y. Shin, G.J. Exarhos, K.J. Kim. Bicontinuous, thermoresponsive, L3-phase silica nanocomposites and their smart drug-delivery applications. *Adv. Mater.* 2005, 17, 634-637.
- 212 I.I. Slowing, B.G. Trewyn, S. Giri, V.S.-Y. Lin. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 1225-1236.
- 213 E. Ruiz-Hernández, A. López, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, O. Terasaki, M. Vallet-Regí. Aerosol-assisted synthesis of magnetic mesoporous silica spheres for drug targeting. *Chem. Mater.* 2007, 19, 3455-3463.

-
- 214 B. Julián-López, C. Boissière, C. Chanéac, D. Grosso, S. Vasseur, S. Miraux, E. Duguet, C. Sánchez. Mesoporous maghemite-organosilica microspheres: a promising route towards multifunctional platforms for smart diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* 2007, 17, 1563-1569.
- 215 E. Ruiz-Hernández, A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí. Mesoporous magnetic microspheres for drug targeting. *Solid State Sci.* 2008, 10, 421-426.
- 216 J. Deere, E. Magner, J.G. Wall, B.K. Hodnett. Mechanistic and structural features of protein adsorption onto mesoporous silicates. *J. Phys. Chem. B.* 2002, 106, 7340-7347.
- 217 M. Hartmann. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chem. Mater.* 2005, 17, 4577-4593.
- 218 M. Vallet-Regí, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano. Bioceramics and pharmaceuticals: a remarkable synergy. *Solid State Sci.* 2007, 9, 768-776.
- 219 M. Vallet-Regí, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano. Drug confinement and delivery in ceramic implants. *Drug Metab. Lett.* 2007, 1, 37-40.
- 220 M. Vallet-Regí, M. Manzano, J.M. González-Calbet, E. Okunishi. Evidence of drug confinement into silica mesoporous matrices by STEM spherical aberration corrected microscopy. *Chem. Commun.* 2010, 46, 2956-2958.
- 221 T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990, 24, 721-734.
- 222 J. Fan, C. Yu, F. Gao, J. Lei, B. Tian, L. Wang, Q. Luo, B. Tu, W. Zhou, D. Zhao. Cubic mesoporous silica with large controllable entrance sizes and advanced adsorption properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3146-3150.
- 223 H. Hata, S. Saeki, T. Kimura, Y. Sugahara, K. Kuroda. Adsorption of taxol into ordered mesoporous silicas with various pore diameters. *Chem. Mater.* 1999, 11, 1110-1119.
- 224 P. Horcajada, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous Mesoporous Mater.* 2004, 68, 105-109.
- 225 I. Izquierdo-Barba, A. Martínez, A.L. Doadrio, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí. Release evaluation of drugs from ordered three-dimensional silica structures. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005, 26, 365-373.

-
- 226 F. Qu, G. Zhu, S. Huang, S. Li, J. Sun, D. Zhang, S. Qiu. Controlled release of captopril by regulating the pore size and morphology of ordered mesoporous silica. *Microporous Mesoporous Mater.* 2006, 92, 1-9.
- 227 J. Andersson, J. Rosenholm, S. Areva, M. Linden. Influences of material characteristics on ibuprofen drug loading and release profiles from ordered micro- and mesoporous silica matrices. *Chem. Mater.* 2004, 16, 4160-4167.
- 228 M. Manzano, V. Aina, C.O. Areán, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet-Regí. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization. *Chem. Eng. J.* 2008, 137, 30-37.
- 229 M. Vallet-Regí, J.C. Doadrio, A.L. Doadrio, I. Izquierdo-Barba, J. Pérez-Pariente. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics* 2004, 172, 435-439.
- 230 T. Azaïs, C. Tourné-Péteilh, F. Aussenac, N. Baccile, C. Coelho, J.-M. Devoisselle, F. Babonneau. Solid-state NMR study of ibuprofen confined in MCM-41 material. *Chem. Mater.* 2006, 18, 6382-6390.
- 231 V.S.-Y. Lin, C.-Y. Lai, J. Huang, S.-A. Song, S. Xu. Molecular recognition inside of multifunctionalized mesoporous silicas: toward selective fluorescence detection of dopamine and glucosamine. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 11510-11511.
- 232 C. Tourné-Péteilh, D. Brunel, S. Bégu, B. Chiche, F. Fajula, D. A. Lerner, J. M. Devoisselle. Synthesis and characterisation of ibuprofen-anchored MCM-41 silica and silica gel. *New J. Chem.* 2003, 27, 1415-1418.
- 233 B. Muñoz, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, I. Díaz, M. Vallet-Regí. MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. *Chem. Mater.* 2003, 15, 500-503.
- 234 Q. Tang, Y. Xu, D. Wu, Y. Sun. A study of carboxylic-modified mesoporous silica in controlled delivery for drug famotidine. *J. Solid State Chem.* 2006, 179, 1513-1520.
- 235 P. Horcajada, A. Rámila, G. Férey, M. Vallet-Regí. Influence of superficial organic modification of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Solid State Sci.* 2006, 8, 1243-1249.
- 236 J.C. Doadrio, E.M.B. Sousa, I. Izquierdo-Barba, A.L. Doadrio, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí. Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern. *J. Mater. Chem.* 2006, 16, 462-467.

-
- 237 F. Qu, G. Zhu, S. Huang, S. Li, S. Qiu. Effective controlled release of captopril by silylation of mesoporous MCM-41. *ChemPhysChem* 2006, 7, 400-406.
- 238 M. Colilla, M. Manzano, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, C. Boissière, C. Sánchez. Advanced drug delivery vectors with tailored surface properties made of mesoporous binary oxides submicronic spheres. *Chem. Mater.* 2010, 22, 1821-1830.
- 239 R.O. Darouiche. Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 1422-1429.
- 240 H.W. Bucholz, K. Heinet, G.W. Foerster. Infected prostheses: The role of antibiotic cement. In: R.D. D'Ambrosia, R.L. Marier (Eds.): *Orthopaedic Infections*. Slack, NJ, 1989.
- 241 R.H. Fitzgerald Jr. Infected total hip arthroplasty: Diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 1995, 3, 249-262.
- 242 A.H. Hogt, J. Dankert, J.A. de Vries, J. Feijen. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129, 1959-1964.
- 243 G. Harkes, J. Feijen, J. Dankert. Adhesion of *Escherichia coli* on to a series of poly(methacrylates) differing in charge and hydrophobicity. *Biomaterials* 1991, 12, 853-861.
- 244 B.A. Jucker, H. Harás, S.J. Hug, A.B. Zehnder. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. *Coll. Surf. B.* 1997, 9, 331-343.
- 245 E. Barth, Q.M. Myrvik, W. Wagner, A.G. Gristina. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials* 1989, 10, 325-328.
- 246 A.S. Baker, L.W. Greenham. Release of gentamicin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies. *J. Bone Joint. Surg.* 1988, 70A, 1551-1557.
- 247 R.J. Emerson, T.S. Bergstrom, Y. Liu, E.R. Soto, C.A. Brown, W. Grant McGimpsey, T.A. Camesano. Microscale correlation between surface chemistry, texture, and the adhesive strength of *staphylococcus epidermidis*. *Langmuir* 2006, 22, 11311-11321.
- 248 Y.H. An, R.J. Friedman. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 1998, 43, 338-348.

-
- 249 M.A. Pereira, A.A. Alves, J. Azeredo, M. Mota, R. Oliveira. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 2000, 24, 181-186.
- 250 R. Locci, G. Peters, G. Pulverer. Microbial colonization of prosthetic devices. III. Adhesion of staphylococci to lumina of intravenous catheters perfused with bacterial suspensions. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. B* 1981, 173, 300-307.
- 251 G.D. Ehrlich, F.Z. Hu, Q. Lin, J.W. Costerton, J.C. Post. Intelligent implants to battle biofilms. *ASM News* 2004, 70, 127-133.
- 252 A.G. Gristina. Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987, 237, 1588-1595.
- 253 J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318-1322.
- 254 T. Kyotani. Control of pore structure in carbon. *Carbon* 2000, 38, 269-286.
- 255 A. Ahmadpour, D.D. Do. The preparation of active carbons from coal by chemical and physical activation. *Carbon* 1996, 34, 471-479.
- 256 Z. Hu, M.P. Srinivasan, Y. Ni. Preparation of mesoporous high-surface-area activated carbon. *Adv. Mater.* 2000, 12, 62-65.
- 257 T. Yang, A.C. Lua. Characteristics of activated carbons prepared from pistachio-nut shells by physical activation. *J. Colloid Interf. Sci.* 2003, 267, 408-417.
- 258 R.W. Pekala. Organic aerogels from the polycondensation of resorcinol with formaldehyde. *J. Mater. Sci.* 1989, 24, 3221-3227.
- 259 J. Lee, J. Kim, T. Hyeon. Recent progress in the synthesis of porous carbon materials. *Adv. Mater.* 2006, 18, 2073-2094.
- 260 B. Sakintuna, Y. Yürüm. Templated porous carbons: A review article. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005, 44, 2893-2902.
- 261 A. Vinu, T. Mori, K. Ariga. New families of mesoporous materials. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2006, 7, 753-771.
- 262 J. Lee, S. Yoon, T. Hyeon, S.M. Oh, K.B. Kim. Synthesis of a new mesoporous carbon and its application to electrochemical double-layer capacitors. *Chem. Commun.* 1999, 2177-2178.
- 263 R. Ryoo, S.H. Joo, S. Jun. Synthesis of highly ordered carbon molecular sieves via template-mediated structural transformation. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 7743-7746.

-
- 264 S.V. Dorozhkin, M. Epple. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 3130-3146.
- 265 Y.F. Zhao, J. Ma. Triblock co-polymer templating synthesis of mesostructured hydroxyapatite. *Microporous Mesoporous Mater.* 2005, 87, 110-117.
- 266 Y.F. Zhao, J. Ma, G.E.B. Tan. Synthesis of mesoporous hydroxyapatite through neutral templating. *Int. J. Nanosci.* 2006, 5, 499-503.
- 267 H.L. Wang, L.F. Zhai, Y.H. Li, T.J. Shi. Preparation of irregular mesoporous hydroxyapatite. *Mater. Res. Bull.* 2008, 43, 1607-1614.
- 268 J. Ozaki, N. Endo, W. Ohizumi, K. Igarashi, M. Nakahara, A. Oya. Novel preparation method for the production of mesoporous carbon fiber from a polymer blend. *Carbon* 1997, 35, 1031-1033.
- 269 J. Alcaniz-Monge, D. Cazorla-Amores, A. Linares-Solano, A. Oya, A. Sakamoto, K. Hoshi. Preparation of general purpose carbon fibers from coal tar pitches with low softening point. *Carbon* 1997, 35, 1079-1087.
- 270 N. Patel, K. Okabe, A. Oya. Designing carbon materials with unique shapes using polymer blending and coating techniques. *Carbon* 2002, 40, 315-320.
- 271 R.W. Pekala, D.W. Schaefer. Structure of organic aerogels. 1. Morphology and scaling. *Macromolecules* 1993, 26, 5487-5493.
- 272 T. Valdes-Solis, A.B. Fuertes. High-surface area inorganic compounds prepared by nanocasting techniques. *Mater. Res. Bull.* 2006, 41, 2187-2197.
- 273 T. Kyotani, T. Nagai, S. Inoue, A. Tomita. Formation of new type of porous carbon by carbonization in zeolite nanochannels. *Chem. Mater.* 1997, 9, 609-615.
- 274 J. Rodriguez-Mirasol, T. Cordero, L.R. Radovic, J.J. Rodríguez. Structural and textural properties of pyrolytic carbon formed within a microporous zeolite template. *Chem. Mater.* 1998, 10, 550-558.
- 275 O.D. Velev, T.A. Jede, R.F. Lobo, A.M. Lenhoff. Porous silica via colloidal crystallization. *Nature* 1997, 389, 447-448.
- 276 A.A. Zakhidov, R.H. Baughman, Z. Iqbal, C. Cui, I. Khayrullin, S. O. Dantas, J. Marti, V.G. Ralchenko. Carbon structures with three-dimensional periodicity at optical wavelengths. *Science* 1998, 282, 897-901.
- 277 A. Stein. Sphere templating methods for periodic porous solids. *Microporous Mesoporous Mater.* 2001, 44, 227-239.

-
- 278 S.B. Yoon, G.S. Chai, S.K. Kang, J.-S. Yu, K.P. Gierszal, M. Jaroniec. Graphitized pitch-based carbons with ordered nanopores synthesized by using colloidal crystals as templates. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 4188-4189.
- 279 C.R. Martin. Nanomaterials: a membrane-based synthetic approach. *Science* 1994, 266, 1961-1966.
- 280 A.B. Fuertes. Template synthesis of carbon nanotubes by vapor deposition polymerization. *Carbon* 2002, 40, 1600-1602.
- 281 F. Schüth. Non-siliceous mesostructured and mesoporous materials. *Chem. Mater.* 2001, 13, 3184-3195.
- 282 M. Tiemann. Repeated templating. *Chem. Mater.* 2008, 20, 961-971.
- 283 A. Lu, W. Schmidt, A. Taguchi, B. Spliethoff, B. Tesche, F. Schüth. Taking nanocasting one step further: replicating CMK-3 as a silica material. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 3489-3492.
- 284 M. Kang, S.H. Yi, H.I. Lee, J.E. Yie, J.M. Kim. Reversible replication between ordered mesoporous silica and mesoporous carbon. *Chem. Commun.* 2002, 1944-1945.
- 285 J.Y. Kim, S.B. Yoon, J.-S. Yu. Template synthesis of a new mesostructured silica from highly ordered mesoporous carbon molecular sieves. *Chem. Mater.* 2003, 15, 1932-1934.
- 286 M. Kang, D. Kim, S.H. Yi, J.U. Han, J.E. Yie, J.M. Kim. Preparation of stable mesoporous inorganic oxides via nano-replication technique. *Catal. Today* 2004, 93, 695-699.
- 287 J. Roggenbuck, M. Tiemann. Ordered mesoporous magnesium oxide with high thermal stability synthesized by exotemplating using CMK-3 carbon. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 1096-1097.
- 288 B.J. Scott, G. Wirnsberger, G.D. Stucky. Mesoporous and mesostructured materials for optical applications. *Chem. Mater.* 2001, 13, 3140-3150.
- 289 S.H. Joo, S.J. Choi, I. Oh, J. Kwak, Z. Liu, O. Terasaki, R. Ryoo. Ordered nanoporous arrays of carbon supporting high dispersions of platinum nanoparticles. *Nature* 2001, 412, 169-172.
- 290 C.M. Yang, C. Weidenthaler, B. Spliethoff, M. Mamatha, F. Schüth. Facile template synthesis of ordered mesoporous carbon with polypyrrole as carbon precursor. *Chem. Mater.* 2005, 17, 355-358.

-
- 291 A. Lu, A. Kiefer, W. Schmidt, F. Schüth. Synthesis of polyacrylonitrile-based ordered mesoporous carbon with tunable pore structures. *Chem. Mater.* 2004, 16, 100-103.
- 292 Y. Xia, Z. Ynag, R. Mokaya. Simultaneous control of morphology and porosity in nanoporous carbon: graphitic mesoporous carbon nanorods and nanotubules with tunable pore size. *Chem. Mater.* 2006, 18, 140-148.
- 293 S.N. Che, K. Lund, T. Tatsumi, S. Iijima, S.H. Joo, R. Ryoo, O. Terasaki. Direct observation of 3D mesoporous structure by scanning electron microscopy (SEM): SBA-15 silica and CMK-5 carbon. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 2182-2185.
- 294 K.P. Gierszal, M. Jaroniec. Large pore volume carbons with uniform mesopores and macropores: synthesis, characterization, and relations between adsorption parameters of silica templates and their inverse carbon replicas. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 9742-9748.
- 295 W. Schmidt. Calculation of XRD patterns of simulated FDU-15, CMK-5, and CMK-3 carbon structures. *Microporous Mesoporous Mater.* 2009, 117, 372-379.
- 296 A.B. Fuertes. Low-cost synthetic route to mesoporous carbons with narrow pore size distributions and tunable porosity through silica xerogel templates. *Chem. Mater.* 2004, 16, 449-455.
- 297 A.B. Fuertes. Template synthesis of mesoporous carbons with a controlled particle size. *J. Mater Chem.* 2003, 13, 3085-3088.
- 298 J. H. Knox, B. Kaur, G. R. Millward. Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1986, 352, 3-25.
- 299 M. Kaneda, T. Tsubakiyama, A. Carlsson, Y. Sakamoto, T. Ohsuna, O. Terasaki, S. H. Joo, R. Ryoo. Structural study of mesoporous MCM-48 and carbon networks synthesized in the spaces of MCM-48 by electron crystallography. *J. Phys. Chem. B.* 2002, 106, 1256-1266.
- 300 H. Darmstadt, C. Roy, S. Kaliaguine, S. J. Choi, R. Ryoo. Surface chemistry of ordered mesoporous carbons. *Carbon* 2002, 40, 2673-2683.
- 301 L.A. Solovyov, V.I. Zaikovskii, A.N. Shmakov, O.V. Belousov, R. Ryoo. Framework characterization of mesostructured carbon CMK-1 by X-ray powder diffraction and electron microscopy. *J. Phys. Chem. B.* 2002, 106, 12198-12202.

-
- 302 J. S. Lee, S.H. Joo, R. Ryoo. Synthesis of mesoporous silicas of controlled pore wall thickness and their replication to ordered nanoporous carbons with various pore diameters. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 1156-1157.
- 303 J. Lee, K. Sohn, T. Hyeon. Fabrication of novel mesocellular carbon foams with uniform ultralarge mesopores. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 5146-5147.
- 304 A.B. Fuertes. Synthesis of ordered nanoporous carbons of tunable mesopore size by templating SBA-15 silica materials. *Microporous Mesoporous Mater.* 2004, 67, 273-281.
- 305 A.B. Fuertes, D.M. Nevskaya. Control of mesoporous structure of carbons synthesised using a mesostructured silica as template. *Microporous Mesoporous Mater.* 2003, 62, 177-190.
- 306 S.B. Yoon, K. Sohn, J.Y. Kim, C.-H. Shin, J.-S. Yu, T. Hyeon. Fabrication of carbon capsules with hollow macroporous core/mesoporous shell structures. *Adv. Mater.* 2002, 14, 19-21.
- 307 C. Yu, J. Fan, B. Tian, D. Zhao, G.D. Stucky. High-yield synthesis of periodic mesoporous silica rods and their replication to mesoporous carbon rods. *Adv. Mater.* 2002, 14, 1742-1745.
- 308 H. Yang, Q. Shi, X. Liu, S. Xie, D. Jiang, F. Zhang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao. Synthesis of ordered mesoporous carbon monoliths with bicontinuous cubic pore structure of Ia3d symmetry. *Chem. Commun.* 2002, 2842-2843.
- 309 A. Taguchi, J.-H. Småt, M. Lindén. Carbon monoliths possessing a hierarchical, fully interconnected porosity. *Adv. Mater.* 2003, 15, 1209-1211.
- 310 H. Yang, Q. Shi, B. Tian, S. Xie, F. Zhang, Y. Yan, B. Tu, D. Zhao. A fast way for preparing crack-free mesostructured silica monolith. *Chem. Mater.* 2003, 15, 536-541.
- 311 S. Alvarez, J. Esquena, C. Solans, A.B. Fuertes. Meso/macroporous carbon monoliths from polymeric foams. *Adv. Eng. Mater.* 2004, 6, 897-899.
- 312 C.D. Liang, Z. Li, S. Dai. Mesoporous carbon materials: synthesis and modification. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 3696-3717.
- 313 X. Wang, C. Liang, S. Dai. Facile synthesis of ordered mesoporous carbons with high thermal stability by self-assembly of resorcinol-formaldehyde and block copolymers under highly acidic conditions. *Langmuir* 2008, 24, 7500-7505.

-
- 314 C.D. Liang, K.L. Hong, G.A. Guiochon, J.W. Mays, S. Dai. Synthesis of a large-scale highly ordered porous carbon film by self-assembly of block copolymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 5785-5789.
- 315 F. Zhang, Y. Meng, D. Gu, Y. Yan, Z. Chen, B. Tu, D. Zhao. An aqueous cooperative assembly route to synthesize ordered mesoporous carbons with controlled structures and morphology. *Chem. Mater.* 2006, 18, 5279-5288.
- 316 A. Stein, Z. Wang, M.A. Fierke. Functionalization of porous carbon materials with designed pore architecture. *Adv. Mater.* 2008, 20, 1-29.
- 317 J.L. Bahr, J.M. Tour. Covalent chemistry of single-wall carbon nanotubes. *J. Mater. Chem.* 2002, 2, 1952-1958.
- 318 M.J. Lázaro, L. Calvillo, E.G. Bordejé, R. Moliner, R. Juan, C.R. Ruiz. Functionalization of ordered mesoporous carbons synthesised with SBA-15 silica as template. *Microporous Mesoporous Mater.* 2007, 103, 158-165.
- 319 M.M. Titirici, A. Thomas, M. Antonietti. Aminated hydrophilic ordered mesoporous carbons. *J. Mater. Chem.* 2007, 17, 3412-3418.
- 320 J. Chen, M.A. Hamon, H. Hu, Y.S. Chen, A.M. Rao, P.C. Eklund, R.C. Haddon. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science* 1998, 282, 95-98.
- 321 C.A. Dyke, J.M. Tour. Solvent-free functionalization of carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1156-1157.
- 322 R. Gadiou, S.-E. Saadallah, T. Piquero, P. David, J. Parmentier, C. Vix-Guterl. The influence of textural properties on the adsorption of hydrogen on ordered nanostructured carbons. *Microporous Mesoporous Mater.* 2005, 79, 121-128.
- 323 H. Zhou, S. Zhu, M. Hibino, I. Honma, M. Ichihara. Lithium storage in ordered mesoporous carbon (CMK-3) with high reversible specific energy capacity and good cycling performance. *Adv. Mater.* 2003, 15, 2107-2111.
- 324 D. Lee, J. Lee, J. Kim, J. Kim, H.B. Na, B. Kim, C.-H. Shin, J.H. Kwak, A. Dohnalkova, J.W. Grate, T. Hyeon, H.-S. Kim. Simple fabrication of a highly sensitive and fast glucose biosensor using enzymes immobilized in mesocellular carbon foam. *Adv. Mater.* 2005, 17, 2828-2833.
- 325 J.J. Lee, S. Han, H. Kim, J.H. Koh, T. Hyeon, S.H. Moon. Performance of CoMoS catalysts supported on nanoporous carbon in the hydrodesulfurization of dibenzothiophene and 4,6-dimethyldibenzothiophene. *Catal. Today* 2003, 86, 141-149.

-
- 326 A. Vinu, C. Streb, V. Murugesan, M. Hartmann. Adsorption of cytochrome c on new mesoporous carbon molecular sieves. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 8297-8299.
- 327 A. Vinu, M. Miyahara, V. Sivamurugan, T. Mori, K. Ariga. Large pore cage type mesoporous carbon, carbon nanocage: a superior adsorbent for biomaterials. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 5122-5127.
- 328 Z. Gu, B. Deng. Use of iron-containing mesoporous carbon (IMC) for arsenic removal from drinking water. *Environ. Eng. Sci.* 2007, 24, 113-121.
- 329 H. Zhou, S. Zhu, M. Hibino, I. Honma, M. Ichihara. Lithium storage in ordered mesoporous carbon (CMK-3) with high reversible specific energy capacity and good cycling performance. *Adv. Mater.* 2003, 15, 2107-2111.
- 330 T.W. Kim, I.S. Park, R. Ryoo. A synthetic route to ordered mesoporous carbon materials with graphitic pore walls. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 4375-4379.
- 331 H. Yang, Y. Yan, Y. Liu, F. Zhang, R. Zhang, M. Li, Y. Meng, D. Zhao. A simple melt impregnation method to synthesize ordered mesoporous carbon and carbon nanofiber bundles with graphitized structure from pitches. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 17320-17328.
- 332 S. Alvarez, A.B. Fuertes. Graphitic mesoporous carbons synthesised through mesostructured silica templates. *Carbon* 2004, 42, 3049-3055.
- 333 C.H. Kim, D.-K. Lee, T. J. Pinnavaia. Graphitic mesostructured carbon prepared from aromatic precursors. *Langmuir* 2004, 20, 5157-5159.
- 334 M. Choi, R. Ryoo. Ordered nanoporous polymer-carbon composites. *Nature Mater.* 2003, 2, 473-476.
- 335 A.-H. Lu, W. Li, A. Kiefer, W. Schmidt, E. Bill, G. Fink, F. Schüth. Fabrication of magnetically separable mesostructured silica with an open pore system. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 8616-8617.
- 336 A.-H. Lu, W. Schmidt, N. Matoussevitch, H. Bönnermann, B. Spliethoff, B. Tesche, E. Bill, W. Kiefer, F. Schüth. Nanoengineering of a magnetically separable hydrogenation catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 4303-4306.
- 337 I. Hilger, A. Kießling, E. Romanus, R. Hiergeist, R. Hergt, W. Andrä, M. Roskos, W. Linss, P. Weber, W. Weitschies, W.A. Kaiser. Magnetic nanoparticles for selective heating of magnetically labelled cells in culture: preliminary investigation. *Nanotechnology* 2004, 15, 1027-1032.

-
- 338 Y. Cao, J. Cao, M. Zheng, J. Liu, G. Ji, H. Ji. Facile fabrication of magnetic nanocomposites of ordered mesoporous carbon decorated with nickel nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007, 7, 504-509.
- 339 M. Sevilla, P. Valle-Vigón, P. Tartaj, A.B. Fuertes. Magnetically separable bimodal mesoporous carbons with a large capacity for the immobilization of biomolecules. *Carbon.* 2009, 47, 2519-2527.
- 340 W.K. Oh, H. Yoon, J. Jang. Size control of magnetic carbon nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials* 2010, 31, 1342-1348.
- 341 J.A. Harnisch, D.B. Gazda, J.W. Anderegg, M.D. Porter. Chemical modification of carbonaceous stationary phases by the reduction of diazonium salts. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3954-3959.
- 342 A. Vinu, M. Miyahara, K. Ariga. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 6436-6441.
- 343 A. Vinu, K.Z. Hossain, G.S. Kumar, K. Ariga. Adsorption of L-histidine over mesoporous carbon molecular sieves. *Carbon* 2006, 44, 530-536.
- 344 M. Hartmann, A. Vinu, G. Chandrasekar. Adsorption of vitamin E on mesoporous carbon molecular sieves. *Chem. Mater.* 2005, 17, 829-833.
- 345 J.C. Bokros. Carbon biomedical devices. *Carbon* 1977, 15, 355-371.
- 346 Y.-P. Sun, F. Fu, Y. Lin, W. Huang. Functionalized carbon nanotubes: properties and applications. *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 1096-1104.
- 347 N. Sinha, J.T.-W. Yeow. Carbon nanotubes for biomedical applications. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2005, 4, 180-195.
- 348 A. Abarrategia, M.C. Gutiérrez, C. Moreno-Vicente, M.J. Hortigüela, V. Ramosa, J.L. López-Lacomba, M.L. Ferrer, F. del Monte. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials* 2008, 29, 94-102.
- 349 M. Endo, M. Strano, P.M. Ajayan. Potential applications of carbon nanotubes. In: A. Jorio, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus (Eds.): *Carbon nanotubes. Topics Appl. Physics* 2008, 111, 13-62. Springer-Verlag, Berlin.
- 350 M. Vila, J.L. Hueso, M. Manzano, I. Izquierdo-Barba, A. de Andrés, J. Sánchez-Marcos, C. Prieto, M. Vallet-Regí. Carbon nanotubes-mesoporous silica composites as controllable biomaterials. *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 7745-7752.

-
- 351 G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 1378-1383.
- 352 J.-P. Kaiser, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, A. Bruinink. Single walled carbon nanotubes (SWCNT) affect cell physiology and cell architecture. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2008, 19, 1523-1527.
- 353 N.W.S. Kam, T.C. Jessop, P.A. Wender, H. Dai. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 6850-6851.
- 354 L.P. Zanello, B. Zhao, H. Hu, R.C. Haddon. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett.* 2006, 6, 562-567.
- 355 A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J.W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forró. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.* 2006, 6, 1121-1125.
- 356 C. Cheng, K.H. Müller, K.K.K. Koziol, J.N. Skepper, P.A. Midgley, M.E. Welland. Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells. *Biomaterials* 2009, 30, 4152-4160.
- 357 M. Otero, C.A. Grande, A.E. Rodrigues. Adsorption of salicylic acid onto polymeric adsorbents and activated charcoal. *React. Funct. Polym.* 2004, 60, 203-213.
- 358 T.W. Kim, P.W. Chung, I.I. Slowing, M. Tsunoda, E.S. Yeung, V.S.-Y. Lin. Structurally ordered mesoporous carbon nanoparticles as transmembrane delivery vehicle in human cancer cells. *Nano Lett.* 2008, 8, 3724-3727.
- 359 C. Ostiguy, B. Soucy, G. Lapointe, C. Woods, L. Ménard, M. Trottier. Health effects of nanoparticles. *Studies and Research Projects. Report R-589*, Montréal, IRSST, 2008.
- 360 F. Balas, M. Arruebo, J. Urrutia, J. Santamaría. Reported nanosafety practices in research laboratories Worldwide. *Nature Nanotech.* 2010, 5, 93-96.
- 361 S.V. Mikhalovsky. Emerging technologies in extracorporeal treatment: focus on adsorption. *Perfusion* 2003, 18, 47-54.
- 362 D.J. Malik, G.L. Warwick, M. Venturi, M. Streat, K. Hellgard, N. Hoenich, J.A. Dale. Preparation of novel mesoporous carbons for the adsorption of an inflammatory cytokine (IL-1 β). *Biomaterials* 2004, 25, 2933-2940.

-
- 363 D.J. Malik, G.L. Warwick, I. Mahtieson, N.A. Noenich, M. Streat. Structured carbon haemoadsorbents for the removal of middle molecular weight toxins. *Carbon* 2005, 43, 2317-2329.
- 364 G. Yushin, E.N. Hoffman, M.W. Barsoum, Y. Gogotsi, C.A. Howell, S.R. Sandeman, G. J. Phillips, A.W. Lloyd, S.V. Mikhlovsky. Mesoporous carbide-derived carbon with porosity tuned for efficient adsorption of cytokines. *Biomaterials* 2006, 27, 5755-5762.
- 365 S.R. Sandeman, C.A. Howell, S. V. Mikhlovsky, G.J. Phillips, A.W. Lloyd, J.G. Davies, S.R. Tennison, A.P. Rawlison, O.P. Kozynchenko. Inflammatory cytokine removal by an activated carbon device in a flowing system. *Biomaterials* 2008, 29, 1638-1644.
- 366 L.-M. Barnes, G. J. Phillips, J.G. Davies, A. W. Lloyd, E. Cheek, S.R. Tennison, A. P. Rawlison, O.P. Kozynchenko, S.V. Mikhlovsky. The cytotoxicity of highly porous medical carbon adsorbents. *Carbon* 2009, 47, 1887-1895.
- 367 J.C. Elliot. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. *Studies in inorganic chemistry*, Elsevier, 1994.
- 368 M. Vallet-Regí, J.M. González-Calbet. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress. Solid State Sci.* 2004, 32, 2004, 1-31.
- 369 S.V. Dorozhkin. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 2010, 31, 1465-1485.
- 370 R.R. Ramachandra, R. Rai, H.N. Roopa, T.S. Kannan. Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP/ β -TCP composite ceramic powders. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1997, 8, 511-518.
- 371 W. Suchanec, M. Yoshimura. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.* 1998, 13, 94-117.
- 372 A. Wang, H. Yin, D. Liu, H.Wu, Y.Wada, M. Ren, Y. Xu, T. Jiang, X. Cheng. Effects of organic modifiers on the size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods. *Appl. Surf. Sci.* 2007, 253, 3311-3316.
- 373 A. Osaka, Y. Miura, K. Takeuchi, M. Asada, K. Takahashi. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1991, 2, 51-55.

-
- 374 G. Bezzi, G. Celotti, E. Landi, T.M.G. La Torretta, I. Sopyan, A. Tampieri. A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. *Mater. Chem. Phys.* 2003, 78, 816-824.
- 375 F. Wang, M. Li, Y. Lu, Y. Qi. A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Mater. Lett.* 2005, 59, 916-919.
- 376 N. Hijón, M.V. Cabañas, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. Bioactive carbonate-hydroxyapatite coatings deposited onto Ti₆Al₄V substrate. *Chem. Mater.* 2004, 16, 1451-1455.
- 377 L. Bernard, M. Freche, J. L. Lacout, B. Biscans. Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature-influence of purity of the raw material. *Powder Technol.* 1999, 103, 19-25.
- 378 L.M. Rodríguez-Lorenzo, M. Vallet-Regí. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. *Chem. Mater.* 2000, 12, 2460-2465.
- 379 A. Perloff, A.S. Posner. Preparation of pure hydroxyapatite crystals. *Science* 1956, 124, 583-584.
- 380 M. Ashok, S.N. Kalkura, N.M. Sundaram, D. Arivuoli. Growth and characterization of hydroxyapatite crystals by hydrothermal method. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2007, 18, 895-898.
- 381 J. S. Cho, Y.C. Kang. Nano-sized hydroxyapatite powders prepared by flame spray pyrolysis. *J. Alloys Compd.* 2008, 464, 282-287.
- 382 B.-H. Chen, K.-I. Chen, M.-L. Ho, H.-N. Chen, W.-C. Chen, C.-K. Wang. Synthesis of calcium phosphates and porous hydroxyapatite beads prepared by emulsion method. *Mater. Chem. Phys.* 2009, 113, 365-371.
- 383 N. Rameshbabu, K.P. Rao. Microwave synthesis, characterization and in-vitro evaluation of nanostructured biphasic calcium phosphates. *Curr. Appl. Phys.* 2008, 9, S29-S31.
- 384 W. Kim, F. Saito. Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H₃PO₄ solution with Ca(OH)₂. *Ultrason. Sonochem.* 2001, 8, 85-88.
- 385 S. Sasikumar, R. Vijayaraghavan. Effect of metal-ion-to-fuel ratio on the phase formation of bioceramic phosphates synthesized by self-propagating combustion. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2008, 9, 035003.

-
- 386 M.V. Cabañas, J.M. González-Calbet, M. Lebeau, P. Mollard, M. Pernet, M. Vallet-Regí. Evolution of the microstructure and its influence on the magnetic properties of aerosol synthesized $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ particles. *J. Solid State Chem.* 1992, 101, 265-274.
- 387 W. Bonfield, M.D. Grynpas, A. E. Tully, J. Bowman, J. Abram. Hydroxyapatite reinforced polyethylene- a mechanically compatible implant material for bone replacement. *Biomaterials* 1981, 2, 185-186.
- 388 K.A. Gross, C.C. Berndt. Thermal processing of hydroxyapatite for coating production. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 39, 580-587.
- 389 J.A.S. Bett, L.G. Christner, W.K. Hall. Hydrogen held by solids. XII. Hydroxyapatite catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 1967, 89, 5535-5541.
- 390 K. Mori, T. Hara, T. Mizugaki, K. Ebitani, K. Kaneda. Hydroxyapatite-supported palladium nanoclusters: a highly active heterogeneous catalyst for selective oxidation of alcohols by use of molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 10657-10666.
- 391 Y.-J. Tang, Y.-F. Tang, C.-T. Lv, Z.-H. Zhou. Preparation of uniform porous hydroxyapatite biomaterials by a new method. *Applied Surf. Sci.* 2008, 254, 5359-5362.
- 392 S. Bose, S. K. Saha. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique. *Chem. Mater.* 2003, 15, 4464-4469.
- 393 Z.Y. Yuan, J.Q. Liu, L.M. Peng, B.L. Su. Morphosynthesis of vesicular mesostructured calcium phosphate under electron irradiation. *Langmuir* 2002, 18, 2450-2452.
- 394 J. Yao, W. Tjandra, Y.Z. Chen, K.C. Tam, J. Ma, B. Soh. Hydroxyapatite nanostructure material derived using cationic surfactant as a template. *J. Mater. Chem.* 2003, 13, 3053-3057.
- 395 Y.J. Wu, S. Bose. Nanocrystalline hydroxyapatite: micelle templated synthesis and characterization. *Langmuir* 2005, 21, 3232-3234.
- 396 P. Yang, Z. Quan, C. Li, X. Kang, H. Lian, J. Lin. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. *Biomaterials* 2008, 29, 4341-4347.

-
- 397 N. Ikawa, H. Hori, T. Kimura, Y. Oumi, T. Sano. Templating route for mesostructured calcium phosphates with carboxylic acid- and amine-type surfactants. *Langmuir* 2008, 24, 13113-13120.
- 398 N. Ikawa, H. Hori, T. Limura, Y. Oumi, T. Sano. Unique surface property of surfactant assisted mesoporous calcium phosphate. *Microporous Mesoporous Mater.* 2009, doi. 10.1016/j.micromeso.2009.09.019
- 399 N. Ikawa, M. Iwata, Y. Oumi, T. Kimura, T. Ikeda, T. Sano. Understanding of the formation of mesostructured alkylammonium-alkaline earth metal phosphates composed of ionic frameworks. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2009, 9, 627-633.
- 400 G.A. Ozin, N. Varaksa, N. Coombs, J.E. Davies, D.D. Perovic, M. Ziliox. Bone mimetics: a composite of hydroxyapatite and calcium dodecylphosphate lamellar phase. *J. Mater. Chem.* 1997, 7, 1601-1607.
- 401 J. Zhang, M. Fujiwara, Q. Xu, Y. Zhu, M. Iwasa, D. Jiang. Synthesis of mesoporous calcium phosphates using hybrid templates. *Microporous Mesoporous Mater.* 2008, 111, 411-446.
- 402 B. Prélôt, T. Zemb. Calcium phosphate precipitation in catanionic templates. *Mater. Sci. Eng. C* 2005, 25, 553-559.
- 403 S.M. Schmidt, J. McDonald, E.T. Pineda, A.M. Verwilt, Y.M. Chen, R. Josephs, A.E. Ostafin. Surfactant based assembly of mesoporous patterned calcium phosphate micron-sized rods. *Microporous Mesoporous Mater.* 2006, 94, 330-338.
- 404 M. Fujishima, Y. Okawa, K. Uchida. Hierarchical trimodal porous hydroxyapatite fabricated by colloidal crystal templating using single-size latex particles. *J. Am. Ceram. Soc.* 2008, 91, 3749-3752.
- 405 L. Zhou, D. Wang, W. Huang, A. Yao, C. Xia, X. Duan. Fabrication of hydroxyapatite with highly ordered macroporous frame by colloidal templating method. *Mater. Res. Bull.* 2009, 44, 259-262.
- 406 H. Zhao, W. He, Y. Wang, Y. Yue, X. Gao, Z. Li, S. Yan, W. Zhou, X. Zhang. Biomimetic synthesis of mesoporous hydroxyapatite-calcium pyrophosphate polycrystal using ovalbumin as biosurfactant. *Mater. Chem. Phys.* 2008, 11, 265-270.
- 407 W. He, Z. Li, Y. Wang, X. Chen, X. Zhang, H. Zhao, S. Yan, W. Zhou. Synthesis of mesoporous structured hydroxyapatite particles using yeast cells as the template. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2010, 21, 155-159.

-
- 408 H.C. Shum, A. Bandyopadhyay, S. Bose, D.A. Weitz. Double emulsion droplets as microreactors for synthesis of mesoporous hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 2009, 21, 5548-5555.
- 409 Y. Guo, Y. Zhou, D. Jia, H. Tang. Fabrication and characterization of hydroxycarbonate apatite with mesoporous structure. *Microporous Mesoporous Mater.* 2009, 118, 480-488.
- 410 J. Fan, J. Lei, C. Yu. B. Tu, D. Zhao. Hard-templating synthesis of a novel rod-like nanoporous calcium phosphate bioceramics and their capacity as antibiotic carriers. *Mater. Chem. Phys.* 2007, 103, 489-493.
- 411 Z. Xia, L. Liao, S. Zhao. Synthesis of mesoporous hydroxyapatite using a modified hard-templating route. *Mater. Res. Bull.* 2009, 44, 1626-1629.
- 412 J.M. Kim, S.K. Kim, R. Ryoo. Synthesis of MCM-48 single crystals. *Chem. Commun.* 1998, 259-260.
- 413 X.S. Zhao, G.Q. Lu, A.J. Whittaker, G.J. Millar, H.Y. Zhu. Comprehensive study of surface chemistry of MCM-41 using ^{29}Si CP/MAS NMR, FTIR, pyridine-TPD, and TGA. *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 6525.
- 414 Y. Wan, Y. Shi, D. Zhao. Supramolecular aggregates as templates: ordered mesoporous polymers and carbons. *Chem. Mater.* 2008, 20, 932-945.
- 415 S. Jun, S.H. Joo, R. Ryoo, M. Kruk, M. Jaroniec, Z. Liu, T. Ohsuna, O. Terasaki. Synthesis of new, nanoporous carbon with hexagonally ordered mesostructure. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 10712-10713.
- 416 W. Fan, M.A. Snyder, S. Kumar, P.-S. Lee, W. C. Yoo, A. V McCormick, R.L. Penn, A. Stein, M. Tsapatsis. Hierarchical nanofabrication of microporous crystals with ordered mesoporosity. *Nature Mater.* 2008, 7, 984-991.
- 417 J. Kim, J. Lee, T. Hyeon. Direct synthesis of uniform mesoporous carbons from the carbonization of as-synthesized silica/triblock copolymer nanocomposites. *Carbon* 2004, 42, 2711-2719.
- 418 M. Impérator-Clerc, P. Davidson, A. Davidson. Existence of a microporous corona around the mesopores of silica-based SBA-15 materials templated by triblock copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 11925-11933.
- 419 L. Li, H. Song, X. Chen. Ordered mesoporous carbons from the carbonization of sulfuric-acid-treated silica/triblock copolymer/sucrose composites. *Microporous Mesoporous Mater.* 2006, 94, 9-14.

-
- 420 C.D. Liang, S. Dai. Synthesis of mesoporous carbon materials via enhanced hydrogen-bonding interaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 5316-5317.
- 421 Z. Liu, O. Terasaki, T. Ohsuna, K. Hiraga, H.J. Shin, R. Ryoo. An HREM study of channel structures in mesoporous silica SBA-15 and platinum wires produced in the channels. *Chem. Phys. Chem.* 2001, 2, 229-231.
- 422 R. Schmidt, R. Schmidta, M. Stöckera, D. Akporiayea, E.H. Tørstadb, A. Olsenb. High-resolution electron microscopy and X-ray diffraction studies of MCM-48. *Microporous Mater.* 1995, 5, 1-7.
- 423 J. Xu, Z. Luan, H. He, W. Zhon, L. Kevan. A reliable synthesis of cubic mesoporous MCM-48 molecular sieves. *Chem. Mater.* 1998, 10, 3690-3698.
- 424 Y. Sakamoto, M. Kaneda, O. Terasaki, D.Y. Zhao, J.M Kim, G.D. Stucky, H.J. Shin, R. Ryoo. Direct imaging of the pores and cages of three-dimensional mesoporous materials. *Nature* 2000, 408, 449-453.
- 425 Y. Sakamoto, T.-W. Kim, R. Ryoo, O. Terasaki. Three-dimensional structure of large-pore mesoporous cubic Ia-3d silica with complementary pores and its carbon replica by electron crystallography. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 5231-5234.
- 426 Z.Q. Li, C.J. Lu, Z.P. Xia, Y. Zhou, Z. Luo. X-ray diffraction patterns of graphite and turbostratic carbon. *Carbon* 2007, 45, 1686-1695.
- 427 N. Tsubouchi, K. Xu, Y. Ohtsuka. Carbon crystallization during high-temperature pyrolysis of coals and the enhancement by calcium. *Energy Fuels* 2003, 17, 1119-1125.
- 428 K. Nakajima, M. Okamura, J.N. Kondo, K. Domen, T. Tatsumi, S. Hayashi, M. Hara. Amorphous carbon bearing sulfonic acid groups in mesoporous silica as a selective catalyst. *Chem. Mater.* 2009, 21, 186-193.
- 429 S. Brunauer, L.S. Deming, W.S. Deming, E. Teller. Multimolecular adsorption of gases on silica gel. *J. Am. Chem. Soc.* 1940, 62, 1723-1728.
- 430 K.P. Gierszal, M. Jaroniec. Large pore volume carbons with uniform mesopores and macropores: synthesis, characterization, and relations between adsorption parameters of silica templates and their inverse carbon replicas. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 9742-9748.
- 431 J.P. Olivier. Improving the models used for calculating the size distribution of micropore volume of activated carbons from adsorption data. *Carbon* 1998, 36, 1469-1472.

-
- 432 S.B. Yoon, J.Y. Kim, J.-S. Yu. A direct template synthesis of nanoporous carbons with high mechanical stability using as-synthesized MCM-48 hosts. *Chem. Commun.* 2002, 1536-1537.
- 433 M. Kruk, M. Jaroniec, R. Ryoo, S.H. Joo. Characterization of ordered mesoporous carbons synthesized using MCM-48 silicas as templates. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 7960-7968.
- 434 M. Kruk, M. Jaroniec, Y. Sakamoto, O. Terasaki, R. Ryoo, C.H. Ko. Determination of pore size and pore wall structure of MCM-41 by using nitrogen adsorption, transmission electron microscopy, and X-ray diffraction. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 292-301.
- 435 P.I. Ravikovitch, A.V. Neimark. Relations between structural parameters and adsorption characterization of templated nanoporous materials with cubic symmetry. *Langmuir* 2000, 16, 2419-2423.
- 436 A. Vinu, P. Srinivasu, M. Takahashi, T. Mori, V.V. Balasubramanian, K. Ariga. Controlling the textural parameters of mesoporous carbon materials. *Microporous Mesoporous Mater.* 2007, 100, 20-26.
- 437 A. Vinu, M. Hartmann. Characterization and microporosity analysis of mesoporous carbon molecular sieves by nitrogen and organics adsorption. *Catal. Today.* 2005, 102-103, 189-196.
- 438 B.C. Lippens, B.G. Linsen, J.H. de Boer. Studies on pore systems in catalysts I. The adsorption of nitrogen; apparatus and calculation. *J. Catalysis* 1964, 3, 32-37.
- 439 M. Armandi, B. Bonelli, I. Bottero, C. Otero Areán, E. Garrone. Synthesis and characterization of ordered porous carbons with potential applications as hydrogen storage media. *Microporous Mesoporous Mater.* 2007, 103, 150-157.
- 440 S.-S. Lee, S.H. Joo, R. Ryoo. Synthesis of mesoporous silicas of controlled pore wall thickness and their replication to ordered nanoporous carbons with various pore diameters. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 1156-1157.
- 441 I. Poljanšek, M. Krajnc. Characterization of phenol-formaldehyde prepolymer resins by in line FT-IR spectroscopy. *Acta Chim. Slov.* 2005, 52, 238-244.
- 442 R.K. Iler. The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry of silica. Wiley-Interscience, NY, 1979.

-
- 443 Z. Ma, T. Kyotani, Z. Liu, O. Terasaki, A. Tomita, A. Very high surface area microporous carbon with a three-dimensional nano-array structure: Synthesis and its molecular structure. *Chem. Mater.* 2001, 13, 4413-4415.
- 444 X. Zhang, D.H. Solomon. Carbonization reactions in Novolac resins, hexamethylenetetramine, and furfuryl alcohol mixtures. *Chem. Mater.* 1999, 11, 384-391.
- 445 D.-H. Park, N.Nishiyama, Y. Egashira, K. Ueyama. Enhancement of hydrothermal stability and hydrophobicity of a silica MCM-48 membrane by silylation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001, 40, 6105-6110.
- 446 A. Daehler, S. Boskovic, M. L. Gee, F. Separovic, G. W. Stevens, A. J. O'Connor. Postsynthesis vapor-phase functionalization of MCM-48 with hexamethyldisilazane and 3-aminopropyldimethylethoxysilane for bioseparation applications. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 16263-16271.
- 447 J. Xu, Z.H. Liam, H. He, W.Z. Zhou, L. Keva. A reliable synthesis of cubic mesoporous MCM-48 molecular sieve. *Chem. Mater* 1998, 10, 3690-3698.
- 448 P. Sutra, F. Fajula, D. Brunel, P. Lentz, G. Daelen, J.B. Nagy. ^{29}Si and ^{13}C MAS-NMR characterization of surface modification of micelle-templated silicas during the grafting of organic moieties and end-capping. *Colloids Surf. A* 1999, 158, 21-27.
- 449 X.S. Zhao, G.Q. Lu. Modification of MCM-41 by surface silylation with trimethylchlorosilane and adsorption study. *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 1556-1561.
- 450 B.H. Wouters, T. Chen, M. Dewilde, P.J. Grobet. Reactivity of the surface hydroxyl groups of MCM-41 towards silylation with trimethylchlorosilane. *Microporous Mesoporous Mater.* 2001, 44, 453-457.
- 451 R.P.W. Scott. Silica gel and bonded phases: Their production, properties and use in LC. John Wiley & Sons, West Sussex, England, 1993.
- 452 L.T. Zhuravlev. Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir* 1987, 3, 316-318.
- 453 R.F. Farias, C. Airoidi. Thermogravimetry as a reliable tool to estimate the density of silanols on a silica gel surface. *J. Therm. Ana.* 1998, 53, 751-756.

-
- 454 K.S.W. Sing, R.T. Williams. Review: The use of molecular probes for the characterization of nanoporous adsorbents. Part. Part. Syst. Charact. 2004, 21, 71-79.
- 455 H. El Rassy, P. Buisson, B. Bouali, A. Perrard, A.C. Pierre. Surface characterization of silica aerogels with different proportions of hydrophobic groups, dried by the CO₂ supercritical method. Langmuir 2003, 19, 358-363.
- 456 M.M.L. Ribeiro Carrott, A.J.E. Candeias, P.J.M. Carrott, P.I. Ravikovitch, A.V. Neimark, A.D. Sequeira. Adsorption of nitrogen, neopentane, n-hexane, benzene and methanol for the evaluation of pore sizes in silica grades of MCM-41. Microporous Mesoporous Mater. 2001, 47, 323-337.
- 457 S. Sommer, T. Melin, J.L. Falconer, R.D. Noble. Transport of C₆ isomers through ZSM-5 zeolite membranes. J. Membr. Sci. 2003, 224, 51-67.
- 458 F. Vaudry, S. Khodabandeh, M.E. Davis. Synthesis of pure alumina mesoporous materials. Chem. Mater. 1996, 8, 1451-1464.
- 459 P.A. Russo, M.M. L. Ribeiro Carrott, P.J.M. Carrott. Adsorption of toluene, methylcyclohexane and neopentane on silica MCM-41. Adsorption 2008, 14, 367-375.
- 460 A. Silvestre-Albero, E.O. Jardim, E. Bruijn, V. Meynen, P. Cool, A. Sepúlveda-Escribano, J. Silvestre-Albero, F. Rodríguez-Reinoso. Is there any microporosity in ordered mesoporous silicas? Langmuir 2009, 25, 939-943.
- 461 W.D. Harkins, G. Jura. An adsorption method for the determination of the area of a solid without the assumption of a molecular area, and the area occupied by nitrogen molecules on the surfaces of solids. J. Chem. Phys. 1943, 11, 431-432.
- 462 International Centre for Diffraction Data. Powder Diffraction File 09-0432.
- 463 K. Nakamoto. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Wiley, NY, 1986.
- 464 J. Andersson, S. Areva, B. Spliethoff, M. Lindén. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. Biomaterials 2005, 26, 6827-6835.
- 465 M. Vallet-Regí, L.M. Rodríguez-Lorenzo, A.J. Salinas. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. Solid State Ionics 1997, 101-103, 1279-1285.

-
- 466 K.S.W. Sing. Reporting physisorption data for gas solid systems-with special reference to the determination of surface-area and porosity. *Pure Appl. Chem.* 1982, 54, 2201-2218.
- 467 S. Padilla, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. High specific surface area in nanometric carbonated hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 2008, 20, 5942-5944.
- 468 N. Rangavittal, A.R. Landa-Cánovas, J.M. González-Calbet, M. Vallet-Regí. Structural study and stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate: Two important bioceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 51, 660-668.
- 469 S. Nicolopoulos, M. Vallet-Regí, J.M. González-Calbet. Image processing and fine structure of hydroxyapatite particles. *Solid State Ionics* 1997, 101-103, 175-182.
- 470 S. Nicolopoulos, J.M. González-Calbet, M.P. Alonso, M.T. Gutierrez-Ríos, M.I. de Frutos, M. Vallet-Regí. Characterization by TEM of local crystalline changes during irradiation damage of hydroxyapatite compounds. *J. Solid State Chem.* 1995, 116, 265-274.
- 471 J. Galownia, J. Martin, M.E. Davis. Aluminophosphate-based, microporous materials for blood clotting. *Microporous Mesoporous Mater.* 2006, 92, 61-63.
- 472 J.S. Clifford, R.L. Legge. Use of water to evaluate hydrophobicity of organically-modified xerogel enzyme supports. *Biotechnol. & Bioengineering* 2005, 92, 231-237.
- 473 R. Kumar, H. Chen, J.L.V. Escoto, V.S.-Y. Lin, M. Pruski. Template removal and thermal stability of organically functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Mater.* 2006, 18, 4319-4327.
- 474 S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am.Chem. Soc.* 1938, 60, 309-319.
- 475 E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 373-380.
- 476 M. Kruk, M. Jaroniec, A. Sayari. Application of large pore MCM-41 molecular sieves to improve pore size analysis using nitrogen adsorption measurements. *Langmuir* 1997, 13, 6267-6273.

-
- 477 K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure Appl. Chem.* 1985, 57, 603-619.
- 478 B.C. Lippens, B.G. Linsen, J.H. de Boer. Studies on pore systems in catalysts: V. The t method. *J. Catalysis* 1964, 4, 319-323.
- 479 J.W. McBain, A.M. Bakr. A new sorption balance. *J. Am. Chem. Soc.* 1926, 48, 690-695.
- 480 K. Thrush, P. Connolly. Application of Mc Bain-Bakr adsorption apparatus to zeolite manufacture QC testing. *Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied spectroscopy.* 1998.
- 481 R.C. Reid, J.M. Prausnitz, B.E. Poling. *The properties of gases and liquids.* Mc Graw Hill. New York 1986.
- 482 C.J. Van Oss, L. Ju, M.K. Chaudhury, R.J. Good. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J. Coll. Interf. Sci.* 1989, 128, 313-319.
- 483 J. De Marco, S.E. Biffar, D.G. Reed, M.A. Brooks. The determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonic acid monosodium salt trihydrate in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1989, 7, 1719-1727.

